



HAL
open science

Impact des dommages oxydatifs de l'ADN sur la différenciation des cellules germinales

Amandine Jampy

► **To cite this version:**

Amandine Jampy. Impact des dommages oxydatifs de l'ADN sur la différenciation des cellules germinales. Biologie de la reproduction. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5269 . tel-04760795

HAL Id: tel-04760795

<https://theses.hal.science/tel-04760795v1>

Submitted on 30 Oct 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Laboratoire de Développement des Gonades (UMR SGCSR / U1274)

Impact des dommages oxydatifs de l'ADN sur la différenciation des cellules germinales

Par **Amandine JAMPY**

Thèse de doctorat de Reproduction

Dirigée par **Virginie ROUILLER-FABRE**
Et co-encadrée par **Marie-Justine GUERQUIN**

Présentée et soutenue publiquement
le 15 décembre 2023

Devant un jury composé de :

Géraldine DELBES, Dr, Institut National de la Recherche Scientifique
(Canada), Rapportrice

David VOLLE, Dr, Université Clermont Auvergne, Rapporteur

Julie COCQUET, Dr, Université Paris Cité, Examinatrice

Fabrice SAEZ, Dr, Université Clermont Auvergne, Examineur

Gérard TACHDJIAN, Pr, Université Paris Saclay, Président du jury

Virginie ROUILLER-FABRE, Pr, Université Paris Cité, Directrice de Thèse

Marie-Justine GUERQUIN, Dr, Université Paris Cité, Membre invité et Co-
Encadrante

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Développement des Gonades (LDG)
dirigé par le Pr. Gabriel LIVERA.

Unité mixte de recherche – Stabilité génétique, cellules souches et radiations CEA –
Université Paris – Université Paris Saclay
dirigée par le Dr. François BOUSSIN.

Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (IRCM)
Directeur Dr François BOUSSIN.

Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob
Centre CEA de Fontenay-aux-Roses
18, route du Panorama, BP6,
92 260 Fontenay-aux-Roses, France

CEA/DRF/IBFJ/IRCM/LDG

*« La France est mon pays,
La Provence est ma mère,
Fuveau est mon nid,
Et Corps, mon paradis ! »*

D'après Eugène Long

« Verso l'alto ! »

Pier-Giorgio Frassati

Remerciements du jury

Je souhaite tout d'abord adresser ma profonde gratitude à l'ensemble des membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et du temps qu'ils ont consacré pour cela.

Je remercie tout d'abord le **Pr. Gérard TACHDJIAN** d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie ensuite chaleureusement le **Dr. David VOLLE** de m'avoir accompagnée dans l'avancée de ces travaux en participant à mes CSI, ainsi que le **Dr. Géraldine DELBES** d'avoir fait preuve d'un grand enthousiasme à propos de ce projet lors de nos discussions à l'ETW23. Merci à vous deux d'avoir aujourd'hui accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Je remercie le **Dr. Julie COCQUET** et le **Dr. Fabrice SAEZ** de l'engouement dont ils ont toujours fait preuve vis à vis de ce sujet lors de nos différentes rencontres en congrès et d'avoir accepté aujourd'hui d'assister à ma soutenance en temps qu'examineurs.

Je remercie enfin profondément le **Pr. Virginie ROUILLER-FABRE** et le **Dr. Marie-Justine GUERQUIN** pour leur engagement indéfectible dans ce projet et à mes côtés.

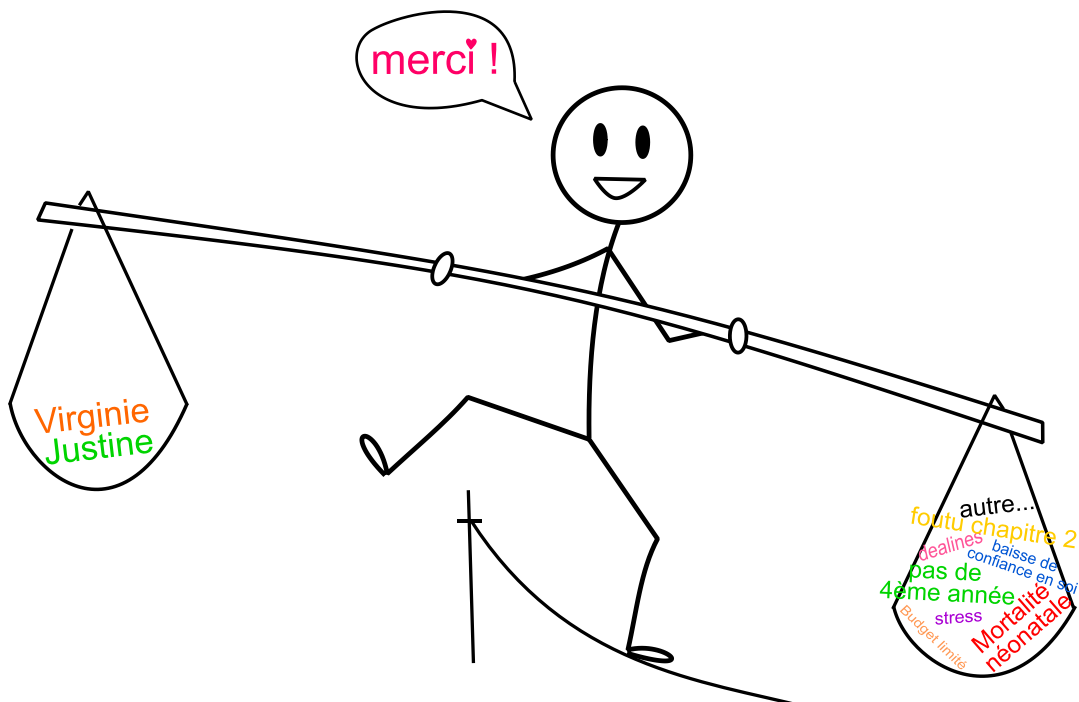
Remerciements

Depuis le début de ma thèse, je pense à ce moment où je devrais écrire ces fameux remerciements. Oh fan, c'est déjà maintenant ! Vous vous doutez que ce n'est pas sans émotion que je rédige ces quelques mots... (ben quoi, vous le savez que je suis bavarde et marseillaise non ?)

Justine, je ne peux pas ne pas commencer par toi. Il me faudrait toute une vie pour exprimer à quel point je suis reconnaissante de t'avoir eu comme « co-encadrante » de thèse. Je le sais, sans toi, je n'y serai pas arrivée ! **MERCI POUR TOUT**, autant scientifiquement qu'humainement, avec l'objectif constant de me tirer vers le haut. Merci pour ta patience et ta disponibilité de chaque instant, même pour mes questions les plus inutiles et saugrenues, ou quand tu m'expliquais la même chose pour la 10^{ème} fois ; merci de ton implication sans faille, surtout quand il fallait revenir le dimanche à ma place, faire des comptages dans le train ou être à la paillasse toute la journée à mes côtés ; merci de ton soutien, au quotidien, au labo, quand je suis passée de l'autre côté de l'estrade, et dans ma vie perso aussi. Merci surtout de ta confiance et de ton écoute, et ce depuis le premier jour de mon stage de M2 : tu as su me booster plus d'une fois, essuyer mes larmes à chaque fois (et les occasions ont été nombreuses !), et partager ta passion pour la recherche avec moi. J'ai tellement appris à tes côtés !! J'espère que tu es fière de l'équipe que l'on a formée et de ce qu'on a fait de ce fameux projet OGG. Bref, merci !

Virginie, si je ne me trompe pas, je serai ta dernière doctorante, quel honneur !! Tu as été la deuxième pièce centrale de ma thèse, dont je n'aurai pas pu me passer. **MERCI** pour ta gentillesse et ta tendresse, merci de ton implication pendant ces quatre années, merci d'avoir veillé sur moi, de m'avoir encouragée, comprise, écoutée, et même applaudi à mon concert de chorale ! Je savais où me rendre si j'avais besoin d'être consolée par un « grand cœur de maman ». Je repars aussi avec tous tes conseils, en particulier le fameux « la chance paye parfois, le travail toujours ! » qui a pris tout son sens à plusieurs reprises durant cette thèse et qui, j'en suis sûre, me sera bien utile aussi après. Dis à Jean-Claude que je m'engage à revenir, quand tu seras à la retraite, pour vous cuisiner un petit gâteau citron meringué !

Justine & Virginie, je crois qu'un de nos points communs est d'aimer les schémas... Voici donc une petite représentation de notre aventure ensemble, avec toute mon affection pour vous deux !



Gabriel, c'est enfin ton tour (honneur aux dames après tout !). Merci d'avoir accepté de m'accueillir dans ton laboratoire depuis plus de 4 ans maintenant, de tes conseils avisés et d'avoir toujours laissé ta porte ouverte si j'en avais besoin, pour parler science mais pas seulement (avec l'avantage que le trajet entre ton bureau et le mien n'était pas très long...). Merci aussi pour la prolongation, qui m'a vraiment permis de finir ma thèse sereinement.

Delphine, ta présence et ton aide ont été précieuses pour moi tout au long de cette thèse. Au niveau labo évidemment, merci en particulier pour ta patience lorsque tu m'as appris à greffer les nues ou plus récemment, l'aventure dot blot. Merci aussi pour tous les « à côté » : nos débriefs en tous genres sur les programmes TV (koh-lanta, pékin express, Doc ou HPI pour ne citer qu'eux), la ferme de Viltain et les petites recettes que l'on se partageait pour cuisiner ce que l'on avait récolté, et tout le reste. Merci enfin de ta profonde gentillesse de ton humour si affûté, tu es toujours là pour donner un coup de main et/ou nous faire sourire !

Seb, merci de tes nombreux conseils en histologie, mais aussi de ton expertise et de ton temps (beaucoup de temps !) en cytométrie. Merci surtout pour ton humour, même s'il m'arrivait de ne pas tout comprendre, et de toujours égayer la salle histo ou les longues heures à l'analyseur par tes blagues, tes sifflements et tes petites chansons. Je n'ai qu'un regret : ne jamais t'avoir entendu jouer de la clarinette. Si tu organises un p'tit concert, je reviens direk' !

Emmanuelle, ta disponibilité et tes nombreux conseils tout au long de ces quatre années ont été inestimables pour moi : du fond du cœur, merci ! Merci aussi de ta patience face à mes nombreuses questions et mes presque aussi nombreux problèmes avec pépère, l'épifluo.

Muriel, merci pour nos discussions sur les statistiques, le sud, la campagne et tout le reste. Merci aussi de tes petits mots gentils pendant la rédaction.

Morgane, merci pour ta douceur et tes encouragements. Bonne route au sein la « famille » LDG et profite de chaque instant, 3 ans, ça passe très vite finalement !

Véro (M.) et Lamya, les voisines de palier ! Je vous remercie de votre gentillesse, votre bienveillance, de votre enthousiasme à participer à chacune de nos « bêtises » (*i.e.* les vidéos de thèse). Véro, ta bonne humeur est communicative ! Je n'ai pas eu l'occasion d'irradier avec toi mais merci pour tout le reste : nos discussions cuisines, filleuls, et tes petits coucous le samedi matin en allant faire le marché. Lamya, merci pour ton aide et tes conseils en microscopie ainsi que pour nos échanges sur les voyages et les enfants.

Christine, merci infiniment de m'avoir accordée de ton temps et de ton expertise pour perfectionner les fameux étalements de métaphase, mais aussi faire les acquisitions, les comptages, et tout le reste ! Merci aussi de ta grande gentillesse et de tes encouragements. Ça a été un vrai plaisir pour moi de travailler avec toi !

Anna, merci de m'avoir encouragée avec tant de bienveillance, d'avoir accepté de participer à mes CSI et d'avoir partagé avec moi un petit bout de tes nombreuses connaissances sur OGG.

Aude et Aurélie, merci infiniment pour votre soutien logistique, et toujours avec le sourire !

Luis et Eléa, sans vous, le bâtiment 05 ne tournerait pas rond très longtemps... Merci pour tout ! Eléa, un merci particulier pour toi ! Merci pour ton soutien (surtout ces derniers temps), ta joie de vivre, de toujours répondre à mes « je ne sais pas si tu as la réponse mais je tente quand même » et surtout, nos conversations en tous genres. Stacy, tu es entre de bonnes mains !

Véro (N.), merci de si bien veiller sur nos petites souris. Je sais qu'à chaque fois, tu me répondais que « c'est ton job », mais je t'assure, ton soutien et tes conseils sont précieux ! Merci aussi pour les cours de pilate cet été, on se sera bien marré, surtout en voyant mes courbatures le lendemain !

Vilma, Caro et Charlotte, dire que je n'osais pas vous « déranger » au début... Je me suis bien rattrapée ! **Vilma**, avec toi, il n'y a pas de problème, que des solutions ! Merci de m'avoir déculpabilisée sur les souris, d'avoir toujours répondu à mes mille interrogations et de m'avoir aidé à chaque fois que je le demandais. Merci enfin d'avoir toujours été cette oreille attentive à laquelle je pouvais me confier (ou râler héhé). **Caro**, mon rayon de soleil, un merci, même grand, n'est définitivement pas suffisant ! Merci pour ta patience, surtout les fameux jeudis matin, où tu étais bien plus rapide à tatouer que moi à gaver ! Merci pour ton grand cœur et ton ouverture d'esprit, et merci de ta bonne humeur qui ne disparaît **jamais** ! Je chéris nos petits « dates » du vendredi 7h et chacune de nos discussions, des sujets les plus futiles à ceux les plus profonds. **Charlotte**, merci pour nos conversations tricots, cyrostat, cuisine &co. Profite à fond de ton rôle de tata, c'est vraiment un des plus beaux au monde ! Les filles, vous êtes plus efficaces que des anti-dépresseurs, et entendre vos éclats de rire va terriblement me manquer !!

Nathalie et Cécile, merci pour vos petites attentions et vos mots gentils. Merci aussi de m'avoir dépannée lors de mes tris Nathalie !

Claire, la copine du 2^{ème}, merci pour les chouquettes, les pauses café, et toutes nos discussions ! C'était vraiment chouette de partager ces moments avec toi.

A tous ceux qui sont passés par le LDG et qui ont partagé un petit bout de cette aventure avec moi, merci ! **Sonia & Nour** merci de m'avoir ouvert la voie et pour tous les petits moments partagés, c'était un réel plaisir à chaque fois. **Vincent, Chiara et Antoine**, vous m'aurez bien fait rire, merci pour tout ! **Laetitia, Lionel et Camille**, c'était un réel plaisir de partager la vie du labo avec vous, vous êtes solaires, merci !

Lucie, nos nombreuses discussions, pro comme perso m'ont vraiment aidée à avancer. Je te remercie pour ta bienveillance, ton rire iconique et ton enthousiasme en général ! J'admire beaucoup la femme que tu es et je te remercie de m'avoir prouvée qu'on peut être épanouie en menant de front vie de maman (de jumeaux qui plus est !) et vie de pharmacienne/chercheuse aguerrie.

Arielle, tu as été un vrai soutien, merci ! Administrativement parlant évidemment, mais je crois que cette barrière a été largement franchie. Je savais que je pouvais venir me réfugier dans ton bureau, retrouver ton oreille attentive (et ta boîte de mouchoir reine des neiges si besoin). J'ai été épatée par ton courage et de ta pugnacité dans l'épreuve, mais aussi par tes talents littéraires : je me répète mais, quelle plume !! Et ce n'est pas parce que je serai à l'autre bout de la France que je ne continuerai pas à dévorer tes bouquins dès leur sortie ! Merci aussi d'avoir partagé avec nous tes joies (et tes galères) de grossesse et de maman de deux petits amours. PS : t'as le bonjour de Marine ;)

Cynthia, merci pour nos éclats de rires, tes conseils sur la thèse mais aussi et surtout sur l'après-thèse, et de m'avoir botté les fesses de temps en temps. Nos échanges sont rares mais très précieux pour moi ! Merci aussi d'avoir été présente pendant la rédaction (même si c'était pour me dévergondner ahah).

Morgane & Iris, le trio de sudistes ! On se sera bien marrées toutes les 3, et même si notre amitié est née au LDG, elle va bien au-delà aujourd'hui. **Moe**, merci pour tout ! Je garderai longtemps en tête tous ces moments passés ensemble : en visio les premiers temps (merci le coco), puis en « vrai » au labo : tu resteras ma Momo les bons tuyaux ! Mais aussi et surtout tous ces week-ends passés à papoter à Fontenay, à refaire nos vies en mangeant des tomates-mozza ou en jouant à la switch. Je me souviens aussi d'une fameuse « chasse à la souris » et d'un certain dimanche soir où tu n'as pas hésité à débarquer. Et depuis ton retour à Nice, à part la distance, (presque) rien n'a changé ! Je suis contente de te voir heureuse, dans ton petit cocon avec Alex et Reïko, et maintenant ta magnifique princesse Lili. **Iris**, presque pas un jour ne passe sans qu'on ne s'écrive toi et moi. Malgré

ce gros défaut de dire chocolatine et de ne pas distinguer nos « suds », tu comptes beaucoup à mes yeux ! Merci pour tous ces moments passés ensemble, toi, moi et souvent Hugo, à visiter Paris ou ses centres commerciaux, mais surtout à découvrir de nouveaux plats/resto ! Merci d'être toujours là, de me faire rire avec tes maladresses ou tes péripéties et de rire de bon cœur aux miennes : au moins, ensemble, on ne s'ennuie jamais ! PS : embrasse Stitch de ma part stp

Et les meilleures pour la fin, la fine équipe, le LDGang !

Pauline, je pense que la plus mémorable de nos péripéties est et restera le testis workshop avec sa vue, son palace, sa fuite d'eau au plafond, son réveil en pleine nuit et sa « boom » bien évidemment ! Tu as une capacité à voir le bien en chaque personne que j'admire. Merci pour ton soutien, surtout ces derniers temps ! Merci aussi d'avoir tracé le sillon de la rédaction/soutenance, je n'avais plus qu'à te suivre ! Merci enfin de ta bonne humeur, tes refs musicales et tout le reste !

Héloïse, ça fait seulement un an que tu as rejoins la clique mais il ne nous a pas fallu longtemps pour t'y intégrer ! Enfin quelqu'un qui me comprenait sur mon côté « organisée » et mon sens de l'orthographe ahah ! Plus sérieusement, je te remercie infiniment de m'avoir faite autant rire, de m'avoir très souvent changé les idées et de m'avoir prodigué tes conseils, en science, en gestion de fin de thèse, et en piggy-sitting aussi ! Je te charge de faire un câlin à Micheline et Lila pour moi !

Victoria, un immense merci ! Ton arrivée au LDG m'a fait l'effet d'une tornade : une boule d'énergie, de franchise et de positivité ! Merci de ton écoute, ton amitié et ta générosité. J'ai savouré chaque fois où l'on avait l'occasion de manipuler ensemble, surtout parce que ça nous laissait le temps d'apprendre un peu plus à se connaître ou de refaire le monde. J'ai aussi été profondément touchée de ta confiance pour garder le secret du « miracle » et heureuse d'avoir partagé avec toi ce grand moment de ta vie... Embrasse Max et ta merveilleuse Elora de ma part stp !

Cathy, j'ai longuement hésité à te mettre dans cette partie ou la suivante... Jamais je n'aurai prédit, quand on s'est échangé nos numéros dans le RER C à la sortie de la réunion de rentrée du M2, que tu allais devenir une des personnes qui compte le plus dans ma vie aujourd'hui... Tu es une des personnes les plus sages, les plus fortes et les plus humbles que je connaisse. Tu as un cœur immense et tu m'as tellement appris. 4 ans, ça fait presque 1500 jours et je me sens tellement heureuse et chanceuse d'avoir partagé tout ce temps avec toi, au labo, à Fontenay, à Paris, à rire, à pleurer, à parler surtout... Bref, ce n'est pas un, mais des milliards de MERCI que je voudrais t'adresser ! Sans toi, je n'en serai pas là ! Mais comme ce serait beaucoup trop long, je te dirais simplement : merci infiniment pour tout, comme d'hab : U da best, et je rajouterai : love U !

En résumé, à l'ensemble du LDG, aux étudiants de la SLF et à chaque personne de l'IRCM, un immense merci, vous allez me manquer !!!

Evidemment, je ne serai pas allée au bout de cette thèse sans le soutien de mes proches, vous qui n'avez pas cessé de croire en moi une seule seconde même si vous ne compreniez pas toujours ce que je faisais de mes journées !

Alice, ma Alicette, je ne sais pas par quoi commencer... Merci pour ton soutien indéfectible, tes encouragements, ton amitié si précieuse pour moi, tes visites à Paris, et surtout nos « calls du dimanche soir », ces petits rdvs qui illuminaient mes semaines. Loin des yeux mais tellement près du cœur, c'est ça la vraie amitié n'est-ce pas ? J'ai hâte de revenir près de toi ! Et merci à ta maman, Nelly, pour sa super « technique » : je suis la meilleure et je vais y arriver !!

Barbara, ma cousine chérie, ma jumelle. Tu le sais, toi et moi c'est pour toujours ! Merci pour tout, nos longues heures au téléphone, tes messages pour me redonner du courage, tes deux mariages pour faire la fête et tout le reste ! Merci aussi à ton **Adrien** de te rendre heureuse, de me faire rire et de pimenter nos parties de jeux de société !

Elise, Pascaline et **Anaïs**, ou plutôt devrais-je dire lilise, bouillah et ninoo, mes amies de toujours ! Merci de votre amour, votre culture, votre joie, ainsi que la lecture et la gastronomie que vous apportez dans ma vie. Merci aussi pour votre humour, votre folie et votre soutien. Peu importe les kilomètres ou le nombre de fois que l'on se voit dans l'année, rien ne change et ça, ça n'a pas de prix ! Un merci particulier pour toi Elise, je suis vraiment heureuse d'avoir vécu mon exil dans le grand nord avec toi et d'avoir pu passer tous ces bons moments ensemble, nos journées filles comme nos sorties avec Mika.

Agathe, ma bichette ! Sans ta main tendue en ce week-end de novembre 2018, je ne serai probablement pas restée à Paris. Que de péripéties depuis, mais notre amitié n'a fait que se renforcer. C'est toujours un immense plaisir pour moi de passer du temps avec toi, en région parisienne, à Corps ou en Normandie ! J'ai hâte d'être à ton mariage et de voir ce que la vie nous réserve, parce que j'en suis sûre, on n'est pas prêtes de se lâcher !

Geneviève, merci d'avoir été ma « maman de Chatenay ». Tu es un exemple pour moi sur bien des plans, ta profonde gentillesse et ta grande foi en premiers ! Quel bonheur ça a été pour moi de partager ces dimanches « messe-déj-balade » avec toi, à papoter sans discontinuer ! C'était de vraies bouffées d'oxygène pour moi et ça va terriblement me manquer... Merci enfin de ton écoute, de ton soutien sans faille et de ta patience (y compris pendant notre séance shopping !). Je t'embrasse affectueusement et j'embrasse Denise par la même occasion.

Agnès, MA rencontre de Fontenay ! Chanter à tes côtés, c'est toujours un honneur et une grande joie ! Merci de ton amitié, de ton soutien et de m'avoir ouvert aussi grand les portes de ton foyer.

Sophie et **Alix**, mes rencontres de M2. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, ces recoins parisiens que vous m'avez fait découvrir et ces petites adresses que l'on a testées.

Marianne, être ta marraine est un de mes plus beaux rôles. Tu es une petite fille, que dis-je, une jeune demoiselle pétillante, astucieuse et bavarde (comme moi). Et même si je ne t'ai pas accordé suffisamment de temps ces quatre dernières années, n'oublie jamais que quelque part, ta marraine-qui-t'aime pense fort et prie pour toi chaque jour !

Auryana, Charlotte, Agathe, Emma et **Liwane**, mes 5 monstres préférés. Je suis si fière de vous et de voir les personnes que vous devenez. Merci d'être mes petits rayons de soleil et de remplir chaque moment que l'on partage de rire et d'amour.

Anne-Sophie, Véronique et **Sophie**, est ce que vous vous rendez compte qu'en ce moment, pendant que l'une passe sereinement le concours de l'INSP, la deuxième monte son entreprise et la troisième a brillamment décroché le droit de reprendre ses études ? Si c'est pas du girl power ça !! Avec **Julien** et **Olivier**, vous êtes une source d'inspiration pour moi. A chacun, merci de votre soutien indéfectible et de votre amour. Vous êtes mes racines et mon bonheur.

Pour finir, **Papa & Maman**. C'est simple, je vous dois **TOUT**. Je vous serai éternellement reconnaissante de l'amour, du soutien, des valeurs, de l'enfance et du confort matériel, bref, de tout ce que vous m'avez offert depuis ma naissance. Un merci particulier pour toi Maman, tu es mon refuge, sans doute la personne qui me connaît le mieux, celle qui sait me redonner le sourire et la motivation en un mot ou deux. Merci infiniment de m'avoir encouragée, soutenue, et parfois même portée pendant ces quatre années. A tous les deux, j'espère vous avoir rendu fiers, je vous aime et vous dédie cette thèse.

Liste des abréviations

β-PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor β-subtype
γH2AX : phosphorylation de la lysine 139 du variant d'histone H2AX
5caC : 5-carboxylcytosine
5fC : 5-formylcytosine
5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine
5mC : 5-méthylcytosine
8OdG : 7,8-dihydro-8-oxoguanine, aussi appelée 8-oxoguanine
8-oxo-dGTP : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AID : Activation Induced cytidine Deaminase
ALP : Phosphatase ALcaline
AMH : Hormone Anti-Müllérienne
AP2γ : Activating enhancer binding Protein 2 Gamma
APE1 : Endonuclease APurinique/APyrimidique 1
APOBEC : APOlipoprotein B mRNA editing Enzyme
AR : Acide Rétinoïque
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adenosine-TriPhosphate
ATR : Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3-related

B

BADGE : Bisphenol A DiGlycidyl Ether
BCL2 : B-Cell Lymphoma 2
BER : Base Excision Repair
BLIMP1 : B lymphocyte-Induced Maturation Protein-1, autre nom de PRDM1
BMP2, BMP4, BMP8b : Bone Morphogenic factor 2, 4, 8b
BPA, BPAF : Bisphenols A et AF

C

CDB : Cassure Double Brin
CDH4 : ChromoDomain Helicase DNA-binding protein 4
CGP : Cellule Germinale Primordiale
CIS : Carcinome In Situ
cKIT : KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase = CD117
CMR : Cancérogène, Mutagène ou Reprotoxique
CO : CrossOver (anglais) ou Crossing-Over (français)
CS : Complexe Synaptonémal
CSS : Cellule Souche Spermatogoniale
CYP26B1 : CYtochrome P450 family 26 subfamily B member 1

D

DAZL : Deleted in AZoospermia-Like

DDR : DNA-Damage Response

DDX4 : DEAD-box helicase 4 = MVH = VASA

DEHP : Di(2-EthylHexyl)Phtalate

DHT : DiHydoTestostérone

DL50 : Dose Létale 50

D-loop : Displacement-loop

DMC1 : Disrupted Meiotic cDNA 1

DMRT1 : Doublesex- and Mab-Related Transcription factor 1

DMRTB1 : DMRT like family B with proline rich C-terminal 1

DND1 : Dead eND1

DNMT1, DNMT3A, DNMT3B : DNA MethylTransferases 1, 3A, 3B

DNMT3L : DNA MethylTransferase 3-Like

DPPA3 : Developmental Pluripotency-Associated Protein 3

E

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

EMX2 : EMpty spiracles homeoboX 2

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ET : Élément Transposable

F

FEZF1 : FEZ Family zinc finger 1

FGF8, FGF9 : Fibroblast Growth Factor 8 et 9

FOXL2 : FORkhead boX family L2

FOXO1 : FORkhead boX O transcription factor 1

FSH : Follicle Stimulating Hormone

G

G4 : G-quadruplex

GATA2, GATA3, GATA4 : GATA binding protein 2, 3 et 4

GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

GFR α 1: GDNF Family Receptor alpha-1

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

H

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

hCGP : Cellule Germinale Primordiale humaine

HOXB1 : HOmeoboX gene B1

H3K4me2/3 : di- ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K36me3 : triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3

I

ID4 : Inhibitor of DNA binding 4

J

JPC : Jour Post-Coïtum

JPP : Jour Post-Partum

K

KBrO3 : bromate de potassium

KO : KnockOut

KRAS : Kirsten RAAt Sarcoma viral oncogene homolog

L

LH : Luteinizing Hormone

LHX9 : Lim HomeoboX protein 9

L-PGDS : Lipocalin ProstaGlandin D Synthase

LSD1 : Lysine-Specific Demethylase 1

M

MAEL : MAELstrom spermatogenic transposon silencer

MAGEA4 : MAGE family member A4

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MBP : Methyl-CpG Binding Proteins

MEHP : Mono-2-EthylHexyl Phtalate

MEIOB : MEiosis specific with OB-fold

MLH1, MLH3 : MutL Homolog 1 et 3

MMR : MisMatch Repair

MOF : Follicule Multi-Ovocytair

MSH6 : MutS Homologue 6

MTH1 : MutT Homologue 1

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

MUTYH : MUTY Homologue DNA glycosylase

N

NAC : N-AcetylCysteine

NANOS3 : NANOS homolog 3

NANOS2 : NANOS C2HC-type zinc finger 2

NANOG : NANOG homeobox

NCO : Non-CrossOver

NEIL1, NEIL3 : NEI endonuclease VIII-Like 1 et 3

NER : Nucleotide Excision Repair

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NGN3 : NeuroGeNin-3

NHEJ : Non-Homologous End Joining

NRF2 : Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2

Nr5a1 : Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, gène codant pour SF1

O

¹O₂ : oxygène singulet

O₂^{•-} : anion superoxyde

o⁸G : 8-hydrOxyGuanosine

OCT4 = OCT3/4 : OCTamer-binding transcription factor 4, codé par le gene POU5F1

OGG1 : 8-OxoGuanine DNA Glycosylase 1

•OH : radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

P

PDGF-B, PGDF-D : Platelet-Derived Growth Factor B et D

PDPN : PoDoPlaNine

PGD2 : ProstaGlandine D2

PE : Polluants Environnementaux

PI3K-AKT : Phosphoinositide 3-Kinase - protéine kinase B

PLZF : Promyelocytic Leukemia Zinc Finger

POLβ : ADN POLymérase β

POU5F1 : POU class 5 homeobox 1, gène codant pour OCT3/4

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptors

pRB : RetinoBlastoma protein

PRDM1, PRDM9, PRDM14 : PR/set DoMain 1, 9 et 14

R

RAD51 : RAD51 recombinase

RAR : Récepteurs de l'Acide Rétinoïque

RASGFR1 : RAS protein-specific Guanine nucleotide-Releasing Factor 1

RET : REceptor Tyrosine kinase

RH : Recombinaison Homologue

RHEB : Ras Homolog Enriched in Brain

ROO• : radicaux peroxydes

RPA : Replication Protein A

RSPO-1 : R-SPOn din gene 1

S

SCF : Stem Cell Factor

scRNA-Seq : Séquençage ARN sur cellules uniques

SDSA : Synthesis Dependant Strand Annealing

SF1 : Steroidogenic Factor 1

SG : Semaines de Grossesse

SIRT1 : SIRTuin type 1

SMAD : Sma Mothers Against Decapentaplegic

SOX2, SOX9, SOX12, SOX17 : Sry-bOX containing gene 2, 9, 12, 17

SP1 : Specificity Protein 1

SPATA22 : SPermatogenesis Associated 22

SPO11 : SPOrulation protein homolog 11

SRY : Sex-determining Region of Y chromosome

SSEA-1 : Stage-Specific Embryonic Antigen 1

STRA8 : STimulated by Retinoic Acid 8

SYCE1, SYCE2, SYCE3 : SYnaptonemal Complex central Element protein 1, 2 et 3

SYCP1, SYCP2, SYCP3 : SYnaptonemal Complex Protein 1,2 et 3

T

TCGT : Tumeur des Cellules Germinales Testiculaires

TCR : Transcription Coupled Repair

TDG : Thymine DNA Glycosylase

TDRD6 : TuDoR Domain containing 6

TET : Ten-Eleven-Translocation

TEX14, TEX15 : Testis EXpressed 14 et 15

TFAP2C : Transcription Factor AP-2 Gamma, gene codant pour AP2γ

TGF-β : Transforming Growth Factor bêta

TOP1 : TOPoisomerase 1

U

UHRF1 : Ubiquitin-like with PHD and RING Finger domains

UVB : Ultra-Violet de type B

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

W

WNT4 : WiNgless-type MMTV integration site family, member 4

WT1 : Wilms Tumor gene 1

X

XRCC1 : scaffold protein X-ray Repair Cros Complementing 1

Z

ZNF267 : ZiNc Finger protein 267

Ce manuscrit suivra la nomenclature recommandée par la Human Genome Organization :

Gene/PROTEINE pour les acteurs murins, *GENE*/PROTEINE pour les acteurs humains.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : LA DIFFERENCIATION DES CELLULES GERMINALES.....	1
A) <i>La différenciation des gonades.....</i>	1
1) La gonade bipotentielle.....	1
2) Différenciation somatique gonadique.....	3
B) <i>Spécification germinale et acquisition de la compétence gamétique.....</i>	7
1) Spécification des cellules germinales primordiales.....	7
2) Migration et colonisation de la gonade.....	8
3) Acquisition de la compétence gamétique.....	9
C) <i>La différenciation femelle des CGP.....</i>	10
1) Initiation méiotique et méiose.....	10
2) Rupture des nids ovigères.....	11
3) La folliculogenèse.....	12
D) <i>La cellule germinale chez le mâle.....</i>	14
1) L'entrée en quiescence.....	14
2) Sortie de quiescence et différenciation.....	17
3) La spermatogenèse.....	21
4) La méiose, spécificité du lignage germinal.....	27
5) La régulation épigénétique de la différenciation germinale et de la méiose.....	35
CHAPITRE II : LA POLLUTION ENVIRONNEMENTALE ET SON IMPACT SUR LA FERTILITE.....	42
A) <i>Les polluants environnementaux et leur impact sur la fertilité.....</i>	42
1) Les perturbateurs endocriniens.....	43
2) Polluants environnementaux et cancers testiculaires.....	50
B) <i>Mécanismes de toxicité.....</i>	51
1) Les altérations épigénétiques.....	52
2) Les PE sources d'oxydation.....	53
CHAPITRE III : LES LESIONS OXYDATIVES DE L'ADN.....	55
A) <i>L'oxydation : un équilibre à trouver.....</i>	55
1) Formation des espèces réactives de l'oxygène.....	55
2) Les ERO, des éléments indispensables.....	56
3) Défauts de la balance oxydative.....	57
B) <i>Lésions oxydatives de l'ADN et 8-oxoguanine.....</i>	58
1) L'oxydation de l'ADN.....	58
2) La 8-oxoguanine.....	59
3) La 8-oxoguanine en réplication.....	61
C) <i>Mécanismes de défense et réparation contre la 8OdG.....</i>	62
1) Le Base Excision Repair.....	62
2) Les autres mécanismes.....	65

D) <i>La 8OdG et OGG1, des rôles épigénétiques</i>	66
E) <i>Un moyen d'étude : le KBrO3</i>	72
OBJECTIFS	74
RESULTATS	76
PARTIE I – L'EXPOSITION FŒTALE AUX BISPHENOLS BADGE ET BPAF ALTERE LA MEIOSE PAR L'OXYDATION DE L'ADN DANS LES OVAIRES DE SOURIS	
	76
PARTIE II – LES LESIONS OXYDATIVES DE L'ADN PRODUITES PENDANT LA VIE NEONATALE ALTERENT DE FAÇON PERMANENTE LA GAMETOGENESE CHEZ LA SOURIS ET ENTRAINENT DES MUTATIONS PONCTUELLES TRANSMISSIBLES A LA PROGENITURE.	
	112
PARTIE III – LES LESIONS OXYDATIVES DE L'ADN ENTRAINE UN RETARD DE DIFFERENCIATION DES CELLULES GERMINALES DANS DES TESTICULES FŒTAUX HUMAINS	
	142
DISCUSSION	145
BISPHENOLS, INFERTILITE ET OXYDATION.....	
	145
IMPACT DES LESIONS OXYDATIVES DE L'ADN SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES GERMINALES CHEZ LE MALE	
	149
ET MAINTENANT ?	
	153
CONCLUSION	
	155
ANNEXE	156
BIBLIOGRAPHIE	191
SUMMARY	
RESUME	

Table des figures

Introduction

Chapitre I : la différenciation des cellules germinales

Figure 1. Evolution du système uro-génital et mise en place de la gonade bipotentielle.	1
Figure 2. Principaux facteurs de transcriptions impliqués dans le développement des crêtes génitales.	2
Figure 3. Les signaux impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades chez la souris.	4
Figure 4. La différenciation sexuelle des gonades.....	6
Figure 5. Le rôle central de BLIMP1 pour les cellules germinales primordiales.....	7
Figure 6. Migration des cellules germinales primordiales chez la souris.	9
Figure 7. Cinétique de l'expression de l'ARNm de Stra8 dans l'ovaire foetal murin.	11
Figure 8. La rupture des nids ovigères.	12
Figure 9. Étapes de la folliculogenèse et les différents types de follicules.	13
Figure 10. Nombre de cellules germinales dans l'ovaire chez la souris et la femme à différents âges.	14
Figure 11. La transition gonocytes-spermatogonies.	17
Figure 12. Mécanismes qui sous-tendent la relocalisation des prospermatogonies à la lame basale et leur reprise de prolifération.	20
Figure 13. La division goniale chez l'homme et la souris.	22
Figure 14. La spermiogenèse.....	25
Figure 15. Cycles de l'épithélium séminifère chez la souris et chez l'Homme.....	26
Figure 16. La méiose mâle chez les mammifères.....	28
Figure 17. Comparaison de la méiose chez le mâle et chez la femelle.	29
Figure 18. La recombinaison homologue.	32
Figure 19. Le complexe synaptonémal.....	34
Figure 20. La méthylation et la déméthylation de l'ADN.	36
Figure 21. Les remaniements de la méthylation de l'ADN au cours de la différenciation des cellules germinales mâles.....	37

Chapitre II : La pollution environnementale et son impact sur la fertilité

Figure 22. Effets des polluants environnementaux sur la santé humaine.	43
Figure 23. Le système endocrinien.....	43
Figure 24. Structure chimique de l'œstradiol, du bisphénol A et de deux de ses analogues.	45
Figure 25. Structure chimique du DEHP et de ses métabolites principaux.....	46
Figure 26. Catégorisation des effets des polluants environnementaux.....	51

Chapitre III : Les lésions oxydatives de l'ADN

Figure 27. Origine des principales espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.	55
Figure 28. Les principales voies de réparation des dommages à l'ADN.	59
Figure 29. Formation et appariement de la 8-oxoguanine.	60
Figure 30. La réparation par excision de base (voie de synthèse courte).	63
Figure 31. Les principaux mécanismes de réparation de la 8-oxoguanine.	65
Figure 32. Les G-quadruplex.	70
Figure 33. Schéma récapitulatif des différents effets de la 8-oxoguanine dans la cellule.	71

Résultats

Figure 34. Maintien des cellules germinales humaines mâles dans un état de pluripotence après une exposition longue au bromate de potassium.	144
---	-----

Introduction

Introduction

Chapitre I : la différenciation des cellules germinales

La différenciation correcte des cellules germinales est un prérequis pour l'obtention de gamètes fonctionnels, capables d'assurer la reproduction sexuée et garantir la pérennité de l'espèce. Chez les mammifères, la différenciation germinale est initiée pendant la vie fœtale et aboutira à la production des gamètes matures et aptes à la fécondation, les spermatozoïdes pour le mâle, et les ovocytes pour la femelle. Dans ce chapitre, nous détaillerons la différenciation des cellules germinales, depuis la spécification du lignage germinal jusqu'à la libération des gamètes fonctionnels en dehors des gonades. Toutefois, nous n'aborderons que succinctement la différenciation somatique et nous développerons particulièrement la voie mâle.

A) La différenciation des gonades

1) La gonade bipotentielle

Chez les mammifères, les ébauches gonadiques se forment très tôt au cours du développement embryonnaire : on parle de mise en place des crêtes génitales ou gonades indifférenciées. Les gonades s'individualisent au niveau du mésoderme intermédiaire, au sein du système uro-génital qui comporte trois segments dans le sens cranio-caudal : 1/ le pronéphros, qui va rapidement régresser mais va contribuer, dans sa partie la plus caudale, à la formation du canal de Wolff ; 2/ le mésonéphros, rein embryonnaire transitoire, qui supportera la formation de la gonade et participera à la formation du canal de Wolff ; et 3/ le métanéphros, qui donnera le rein définitif. Les canaux de Müller sont, quant à eux, issus d'une invagination de l'épithélium cœlomique à proximité du mésonéphros vers 11,5 jours post-coïtum (jpc) (Figure 1). Les canaux de Wolff et de Müller sont indispensables car ils donneront les voies excrétrices des gonades (Tostivint et al., 2021)

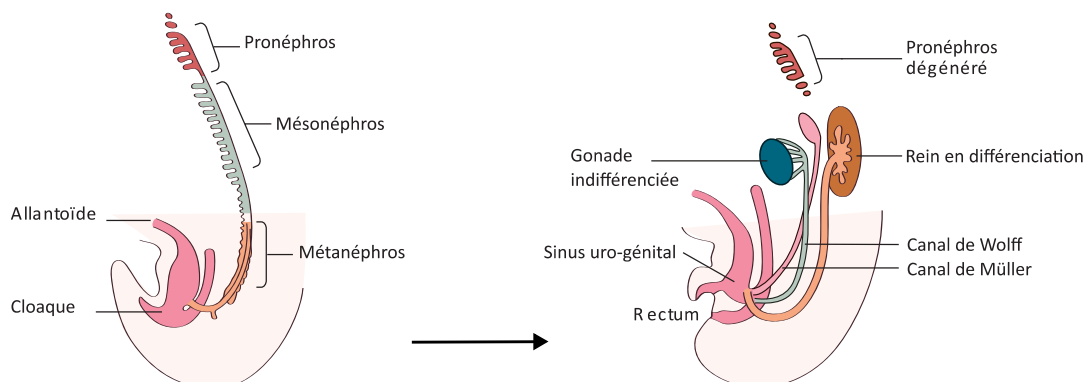


Figure 1. Evolution du système uro-génital et mise en place de la gonade bipotentielle.

L'appareil uro-génital à un stade indifférencié (gauche) est composé de trois segments : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Il va ensuite évoluer pour former l'appareil urinaire et en partie l'appareil génital (droite). Les canaux de Wolff seront formés à partir du pronéphros et du mésonéphros. Le reste du pronéphros régressera rapidement tandis que le métanéphros fournira le rein définitif. Les gonades indifférenciées et les canaux de Müller sont quant à eux formés à partir de l'épithélium cœlomique. Adapté de Tostivint et al. (2021).

Les crêtes génitales résultent de l'épaississement de l'épithélium cœlomique à la surface ventrale de chaque mésonéphros. Ce processus est initié dès 9,5 jpc chez la souris (4-5 semaines de grossesse chez l'Homme). Les gonades indifférenciées, de morphologie allongée, sont constituées de travées, les cordons sexuels primitifs, qui seront, par la suite, colonisées par les cellules germinales. Certains gènes ont été identifiés, chez la souris, pour avoir un rôle dans la différenciation des ébauches gonadiques, en particulier dans la croissance et le maintien de la gonade indifférenciée dans les deux sexes. Le facteur de transcription SF1 (*steroidogenic factor 1*) est notamment impliqué dans la survie et la prolifération des cellules gonadiques somatiques. En effet, chez les souris invalidées pour *Nr5a1* (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*, anciennement *Ftz-F1*), le gène codant pour SF1, on observe une apoptose massive dans l'épithélium cœlomique qui a commencé à s'épaissir et une absence quasi-complète de gonade à 12,5 jpc, chez l'individu XX comme XY, malgré une migration correcte des cellules germinales primordiales (CGP) (Luo et al., 1994). Une régression complète des crêtes génitales est également observée chez les souris invalidées pour les gènes *Wilms tumor gene 1* (*Wt1*) et *empty spiracles homeobox 2* (*Emx2*) ou déficientes pour la protéine *Lim homeobox protein 9* (*Lhx9*), tous trois étant impliqués dans la prolifération des cellules somatiques gonadiques (Birk et al., 2000; Kreidberg et al., 1993; Miyamoto et al., 1997). Il semblerait que ces facteurs de transcription agissent en amont et soient capables d'activer directement l'expression de *Nr5a1*, autorisant le développement des crêtes génitales (Wilhelm and Englert, 2002). Plus récemment, le facteur de transcription GATA4 (*GATA binding protein 4*) a été identifié comme facteur initiateur de la formation des crêtes génitales. En effet, chez les souris invalidées pour *Gata4*, aucun épaississement de l'épithélium cœlomique n'est observé et ni *Lhx9* ni *Nr5a1* n'est exprimé (Hu et al., 2013). L'ensemble de ces processus est résumé dans la figure 2.

La gonade indifférenciée est dite bipotentielle car elle est capable, sous l'influence du sexe génétique (ou chromosomique), d'aboutir à la formation de testicules ou d'ovaires.

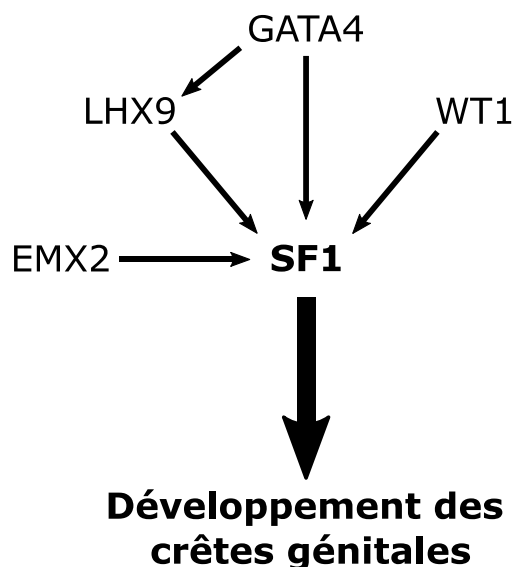


Figure 2. Principaux facteurs de transcriptions impliqués dans le développement des crêtes génitales.

Les facteurs de transcription GATA4, LHX9, WT1 et EMX2 agissent en synergie pour induire l'expression de *Nr5a1*, gène codant pour le facteur de transcription SF1 et ainsi permettre le développement des crêtes génitales. D'après Piprek et al. (2016)

2) Différenciation somatique gonadique

Chez le mâle, la détermination sexuelle est sous le contrôle de l'expression du gène *Sex-determining Region of Y chromosome (Sry)* présent sur le chromosome Y. *Sry* est exprimé entre 10,5 et 12,5 jpc chez la souris, par les progéniteurs sertoliens présents dans les crêtes génitales mâles. C'est la première différence notable entre les gonades XX et XY. SRY est un facteur de transcription qui va induire, en partenariat avec SF1, l'expression de la protéine *Sry-box containing gene 9 (SOX9)*, effecteur principal de la différenciation gonadique (Pour revue, Brennan and Capel, 2004). Il est important de noter que SRY n'est que l'inducteur de la cascade de détermination sexuelle mâle. Chez la souris, sa fenêtre d'action est très limitée dans le temps (les 6 premières heures du 11^{ème} jpc. Figure 3). Si l'expression de *Sry* a lieu après, l'activation de *Sox9* n'est pas maintenue, ce qui entraîne un développement somatique ovarien (Hiramatsu et al., 2009). Ce n'est pas le cas de l'Homme chez qui SRY est exprimé à partir de 6 semaines de grossesse (SG) et jusqu'à plus de 18 SG, même si son expression est asynchrone et limitée spatialement (Hanley et al., 2000). Suite à l'expression de *Sry*, SOX9 est induit et stabilisé. Son expression est nécessaire et suffisante à la formation du testicule (Kobayashi et al., 2005). Cette protéine est capable d'induire l'expression du *Fibroblast growth factor 9 (FGF9)*, ce qui initie une boucle de rétroaction positive SOX9/FGF9. Indépendamment de FGF9, SOX9 induit aussi l'expression de la *lipocalin prostaglandin D synthase (L-PGDS)*, enzyme capable de produire la prostaglandine D2 (PGD2) qui est, à son tour, capable d'activer la transcription de *Sox9* (Colvin et al., 2001; Moniot et al., 2009).

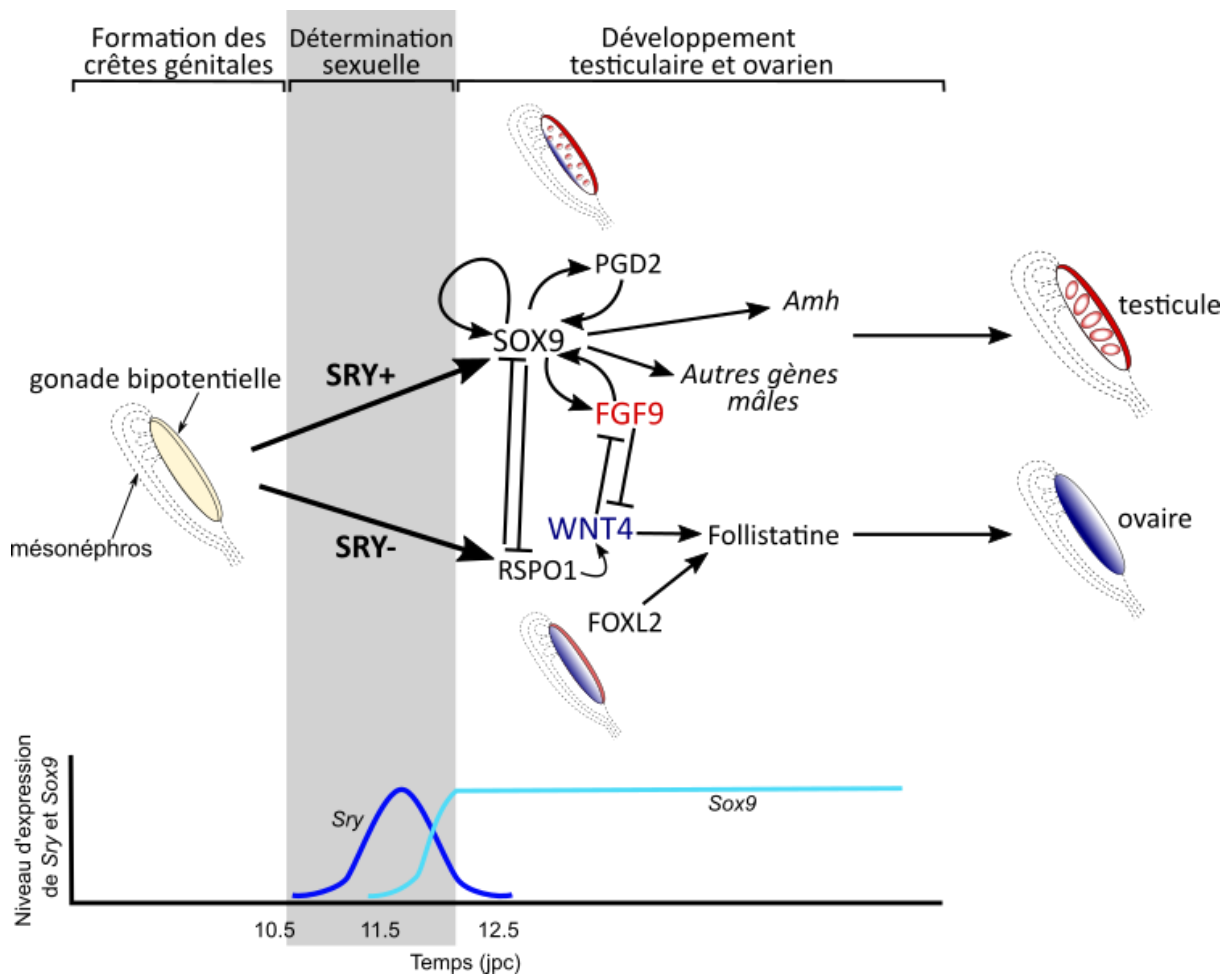


Figure 3. Les signaux impliqués dans la différenciation sexuelle des gonades chez la souris.

La zone grise indique la période de détermination du sexe. Dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle XY, l'expression de *Sry* commence à 10,5 jours *post-coïtum* (jpc), atteint un pic à 11,5 jpc, puis diminue à 12,5 jpc. Quelques heures plus tard, l'expression de *Sox9* est régulée à la hausse pour induire la différenciation des cellules de Sertoli. L'expression de *Sox9* culmine à 12 jpc mais continue d'être exprimée pendant la période post-natale. Elle est soutenue par plusieurs boucles de rétroaction positive (dont *FGF9* (en rouge), *PGD2* et *SOX9* lui-même) et permet d'activer ensuite de nombreux gènes spécifiques au sexe masculin comme l'*Amh*. En l'absence de *SRY*, des gènes tels que *Wnt4* (en bleu), *Rspo1* et *Foxl2* sont exprimés de manière spécifique à la femelle et induisent le développement ovarien, comme le montre l'expression de la *follistatine* spécifique à l'ovaire. Il existe des mécanismes d'inhibition réciproque entre *SOX9* et *RSPO1* et entre *FGF9* et *WNT4*. D'après Kashimada et Koopman (2010).

Au cœur de la gonade, en réponse à *SRY*, *SOX9* va induire la différenciation et la prolifération massive des progéniteurs somatiques en cellules de soutien, les cellules de Sertoli. Celles-ci vont agir comme centre coordinateur de la différenciation testiculaire par sécrétions et interactions paracrines. Par la différenciation des cellules myoïdes périvitubulaires, endothéliales et de Leydig (ordre chronologique d'apparition), les différents compartiments du testicule s'organisent, la vascularisation est établie et les cellules germinales, arrivées entre temps dans la gonade (cf. chapitre I, B, 2) se retrouvent englobées au sein de cordons séminifères, visibles dès 12,5 jpc chez la souris et 6-7 SG chez l'Homme. A partir de ce moment-là, le testicule va également remplir sa fonction hormonale essentielle dans la masculinisation fœtale : les cellules de Sertoli vont produire de l'hormone anti-

müllérienne (AMH), ce qui conduira à la régression des canaux de Müller ; les cellules de Leydig produiront de la testostérone, ce qui aboutira à la stabilisation des canaux de Wolff en épидидyme, canal déférent et vésicule séminale ainsi que, par la suite, grâce à sa métabolisation en dihydrotestostérone (DHT), à la masculinisation des organes génitaux externes (Pour revue, Mäkelä et al., 2019) (Figure 4).

La différenciation ovarienne a longtemps été considérée comme une voie « par défaut », résultat de l'absence d'expression de *Sry*. Cependant, plusieurs facteurs, mis en évidence à partir des années 2000, sont maintenant reconnus comme indispensables pour la différenciation et/ou le maintien de l'ovaire. La protéine *R-spondin gene 1* (RSPO-1), exprimée en premier lieu, a pour rôle, entre autres, d'activer la voie WNT4/ β -caténine (*Wingless-type MMTV integration site family, member 4*) qui joue un rôle crucial dans le maintien de la différenciation ovarienne (Chassot et al., 2008; Vainio et al., 1999). En effet, la différenciation sexuelle repose en réalité sur une balance de signaux antagonistes et qui s'inhibent réciproquement. Les deux acteurs centraux sont WNT4 et FGF9 et la perte de l'un ou l'autre de ces facteurs de croissance induit une inversion sexuelle (Figure 3)(Colvin et al., 2001; Kim et al., 2006; Maatouk et al., 2008; Vainio et al., 1999). WNT4 permet aussi l'expression de la follistatine, nécessaire à la mise en place du réseau vasculaire dans l'ovaire (Yao et al., 2004). L'implication du facteur de transcription FOXL2 (*Forkhead box family L2*) a également été démontrée puisque sa perte de fonction induit une inversion phénotypique chez la chèvre (Pailhoux et al., 2001). Très récemment, l'isoforme -KTS (absence de trois acides aminés entre les deux derniers motifs en doigts de zinc) du facteur de transcription WT1 a été identifiée comme un facteur clé de la détermination du sexe chez la femelle dont la temporalité et la dynamique d'expression sont finement régulés (Gregoire et al., 2023).

Ainsi chez la femelle, sous l'action conjointe de RSPO-1 et WNT4, les progéniteurs somatiques de la gonade indifférenciée donnent naissance aux cellules de la granulosa, la lignée cellulaire de soutien chez la femelle. Elles vont entourer les cellules germinales et former des groupes de cellules appelés nids ovigères, éparpillés au sein de l'ovaire. Au sein d'un nid ovigère, les cellules germinales, en prolifération, présentent une cytokinèse incomplète. Ceci aboutit à la formation d'un syncytium clonal de cellules germinales, issues d'une même cellule-mère, se divisant de manière synchrone et partageant leur cytoplasme, que l'on nomme cyste (C. Wang et al., 2017). Morphologiquement, les ovaires gardent un aspect peu différencié au regard des testicules. Au niveau des voies excrétrices, en absence d'AMH et de testostérone, ce seront les canaux de Wolff qui régresseront et les canaux de Müller qui se différencieront en oviducte, utérus et le tiers supérieur du vagin (Pour revue, Imaimatsu et al., 2022) (Figure 4).

B) Spécification germinale et acquisition de la compétence gamétique

1) Spécification des cellules germinales primordiales

Chez les mammifères, les précurseurs des cellules germinales, appelés cellules germinales primordiales (CGP), proviennent de cellules de l'épiblaste proximal, sous l'influence de signaux émis par l'ectoderme extra-embryonnaire : les *bone morphogenic factor 4, 8b et 2* (BMP4, BMP8b et BMP2) (Matsui and Okamura, 2005; Saitou et al., 2002). En leur absence (invalidations géniques ciblées), les embryons sont dépourvus complètement, ou partiellement en ce qui concerne BMP2, de cellules germinales (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000; Ying and Zhao, 2001). Ces protéines, de la superfamille des TGF- β (*transforming growth factor bêta*), sont capables d'activer la voie des SMAD (acronyme issu de la fusion des gènes *Sma* de *Caenorhabditis elegans* et *Mad*, *Mothers against decapentaplegic*, de la drosophile) et d'induire l'expression de FRAGILIS, une protéine de surface impliquée dans l'adhésion cellulaire et la transduction de signaux anti-prolifératifs (Saitou et al., 2002). A partir de 6,25 jours post-coïtum (jpc) chez la souris, une communauté de cellules exprime de manière franche *Fragilis*. Parmi celles-ci, les cellules germinales primordiales sont spécifiées et commencent à exprimer *PR/SET domain 1/B lymphocyte-induced maturation protein-1* (PRDM1/BLIMP1) qui va avoir trois rôles clefs. D'un côté, BLIMP1 va induire la répression transcriptionnelle du programme somatique (répression de gènes tels que le *fibroblast growth factor 8 (Fgf8)* et *Homeobox gene B1 (Hoxb1)*). De l'autre, BLIMP1 va permettre la stabilisation de l'expression de régulateurs transcriptionnels participant au maintien de la pluripotence et de la prolifération cellulaire tels que OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*, codé par le gène *Pou5f1 – POU Class 5 Homeobox 1*) et SOX2. Enfin, BLIMP1 va favoriser l'expression de gènes plus spécifiques aux cellules germinales tels que *Stella* (aujourd'hui appelé *Developmental Pluripotency-Associated Protein 3 (Dppa3)*), *Transcription Factor AP-2 Gamma (Tfap2c)* et *stage-specific embryonic antigen 1 (Ssea-1)* (Ohinata et al., 2005; Yabuta et al., 2006)(résumé en figure 5). Dès 7,5 jpc, les CGP expriment fortement la phosphatase alcaline (ALP), historiquement utilisée pour repérer les cellules germinales et étudier leur migration dans l'embryon (Ginsburg et al., 1990).

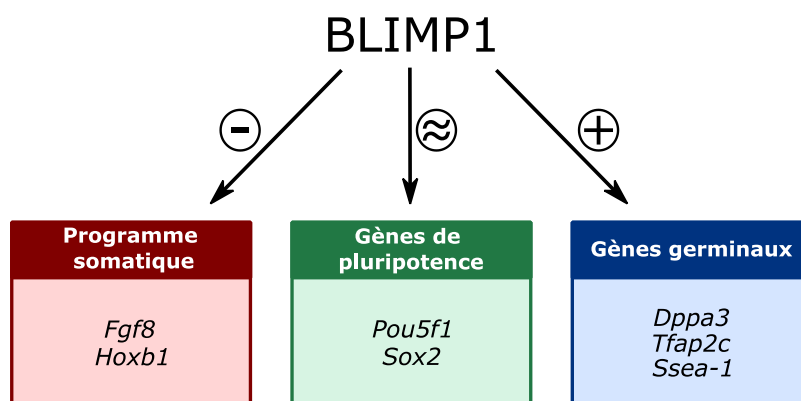


Figure 5. Le rôle central de BLIMP1 pour les cellules germinales primordiales.

BLIMP1 est un facteur de transcription qui va permettre 1/ la répression (signe -) du programme somatique, 2/ la stabilisation (signe ≈) des gènes de pluripotence et 3/ l'activation de l'expression (signe +) des gènes spécifiquement germinaux. Les gènes principaux sont ici détaillés.

Chez l'Homme, Chen *et al.* ont récemment montré, par des analyses de séquençage sur cellules uniques, que la spécification des cellules germinales primordiales humaines (hCGP) débutait dès 12 jours post-fécondation, avant même la formation de la ligne primitive et la gastrulation de l'embryon (Chen et al., 2019). Il semblerait que la spécification des hCGP soit dépendante de l'activation des facteurs de transcription GATA3 et GATA2 (*GATA binding protein 3* et 2) par les BMP (Kojima et al., 2021). Ainsi, à 4 SG, les hCGP sont bien délimitées des cellules somatiques de l'épithélium de l'intestin postérieur et expriment des gènes clefs tels que *SOX17* et *TFAP2C* (qui code pour la protéine AP2γ, *activating enhancer binding protein 2 gamma*), deux facteurs de transcription qui permettent l'expression de *BLIMP1* (même rôle que chez la souris)(Fujimoto et al., 1977; Mamsen et al., 2012; Witschi, 1948).

2) Migration et colonisation de la gonade

Restées à la base de l'allantoïde tout au long de la spécification, les CGP vont entamer une phase de migration en direction des crêtes génitales dès 7,5 jpc chez la souris, et 4 SG chez l'Homme (Anderson et al., 2000; Tam and Snow, 1981). Par des mouvements morphogéniques, les CGP vont d'abord être incorporées dans l'endoderme de l'intestin postérieur vers 8,5 jpc (Anderson et al., 2000). Elles vont ensuite migrer le long du mésentère dorsal pour coloniser, à partir de 10,5 jpc, les crêtes génitales, ébauches gonadiques accolées aux mésonéphros (Molyneaux et al., 2001) (Figure 6). Chez l'Homme, les hCGP atteindront les crêtes génitales au cours de la 6^{ème} semaine de grossesse (Fujimoto et al., 1977; Mamsen et al., 2012; Witschi, 1948). Même si tous les mécanismes impliqués ne sont pas encore compris, il semble que la migration des CGP se fasse à la fois de manière passive (par des mouvements morphogéniques) et de manière active, par d'étroites collaborations avec l'environnement somatique autant que par les protrusions cytoplasmiques émises par les CGP elles-mêmes (Anderson et al., 2000; Laird et al., 2011; Molyneaux et al., 2003; Runyan et al., 2006).

Depuis leur spécification, tout au long de leur migration et jusqu'à 2/3 jours après leur arrivée dans la gonade primitive, les cellules germinales prolifèrent activement (De Felici et al., 2004). Chez la souris, le temps de doublement des CGP est plutôt uniforme entre 8,5 et 12,5 jpc, à savoir d'environ 16h, contre moins de 7h avant spécification (Lawson and Hage, 1994; Tam and Snow, 1981), ce qui correspond à 8 à 12 divisions cellulaires entre la spécification et la fin de la colonisation de l'ébauche gonadique. Au nombre de 50/100 dans l'allantoïde, ce sont environ 1 000 CGP qui colonisent la gonade à 10,5 jpc chez la souris et entre 10 000 et 20 000 cellules qui s'engagent en différenciation à 13,5 jpc (Lawson and Hage, 1994; McLaren, 2000; Tam and Snow, 1981). Chez l'Homme, le nombre de hCGP augmente également de manière exponentielle et cette phase proliférative persiste également au-delà de la colonisation de la gonade.

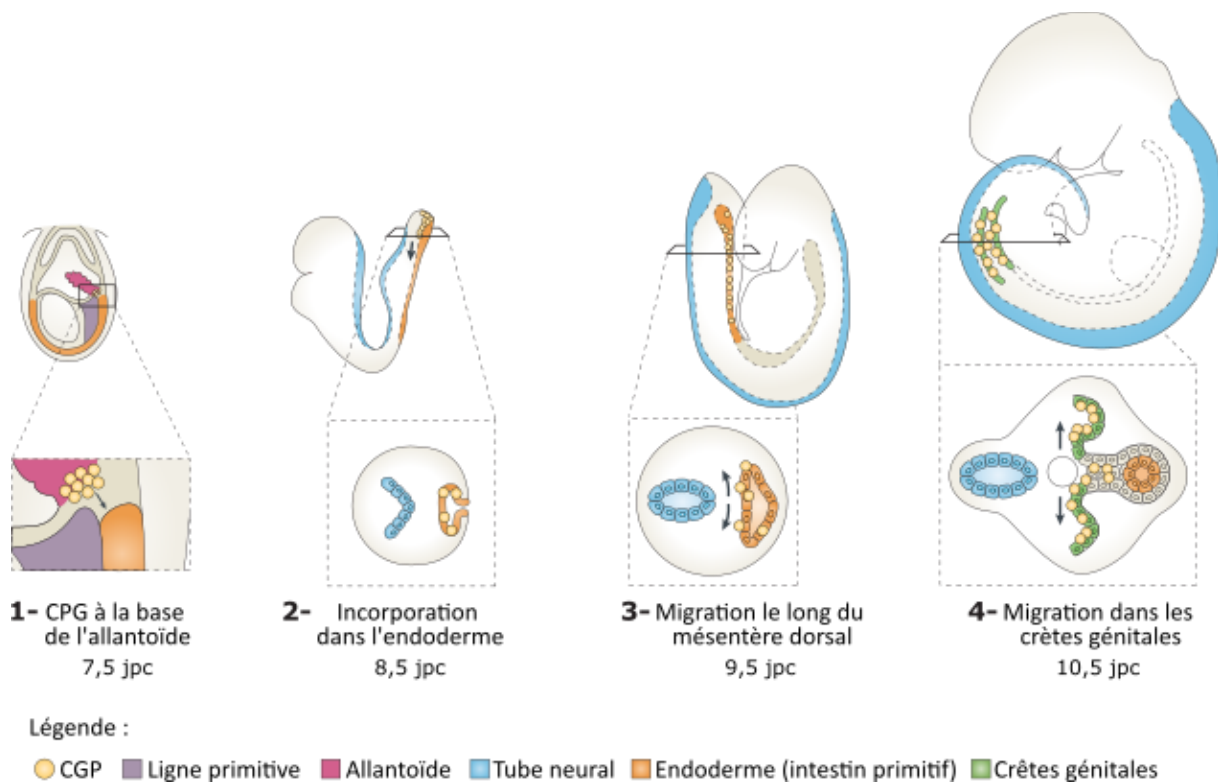


Figure 6. Migration des cellules germinales primordiales chez la souris.

Les cellules germinales primordiales (CGP) sont spécifiées au niveau de l'épiblaste proximal dès 6,25 jours *post-coïtum* (jpc) chez la souris. Dès 7,5 jpc, elles vont entamer une migration pour rejoindre les gonades en différenciation. Elles seront d'abord incorporées dans l'endoderme par des mouvements morphogénétiques (8,5 jpc) puis migreront le long du mésentère dorsal (9,5 jpc) pour rejoindre les crêtes génitales à 10,5jpc. Adapté de Richardson et Lehman (2010).

3) Acquisition de la compétence gamétique

Après colonisation de la gonade, les CGP vont initier un programme transcriptionnel spécifiquement germinale, qui les prépare à la méiose et les protège de la réactivation des rétrotransposons : on parle d'acquisition de la compétence gamétique. Ainsi, sous-tendu par des remodelages épigénétiques (*cf.* chapitre I, D, 5), les CGP vont progressivement éteindre le programme de pluripotence au profit de l'expression de gènes clés tels que *DEAD-box helicase 4* (*Ddx4*, aussi appelée *Vasa* ou *Mvh*) et *deleted in azoospermia-like* (*Dazl*), et plusieurs gènes de méiose comme *Sycp3* (*synaptonemal complex protein 3*), et *Dmc1* (*disrupted meiotic cDNA 1*) (Chuma and Nakatsuji, 2001; Seligman and Page, 1998; Toyooka et al., 2000).

Ddx4 est une hélicase de l'ARN ATP-dépendante, très conservée (des invertébrés à l'Homme), présente dans le cytoplasme des cellules germinales fœtales et adultes. Elle est chargée de contrôler la qualité des ARN messagers (leur repliement correct notamment) et de réguler leur devenir (traduction ou dégradation) (Carrera et al., 2000; Yajima and Wessel, 2011). La délétion de *Ddx4* chez la souris conduit à une stérilité, uniquement des individus mâles, avec une diminution de la prolifération des CGP et un blocage entre les stades leptotène et zygotène de la prophase I méiotique

(Tanaka et al., 2000). Cela semble être lié au rôle particulier de DDX4 dans la répression des rétrotransposons dans les cellules germinales mâles (Kuramochi-Miyagawa et al., 2010).

De son côté, DAZL est une protéine chargée de stabiliser les ARN messagers de nombreux gènes méiotiques et de réguler leur traduction (Rosario et al., 2017). Cette protéine est considérée comme le facteur responsable de l'acquisition de la compétence gamétique par les cellules germinales ou « *licensing* ». Ce remaniement de l'expression génique leur confère la capacité future à s'engager en ovogenèse ou en spermatogenèse et à réaliser la méiose (Gill et al., 2011). L'invalidation de *Dazl* induit une stérilité complète des deux sexes avec, dans les fœtus de souris, une persistance des CGP dans un état pluripotent (expression de NANOG (*Nanog Homeobox*) et SOX2 notamment), similaire à celui des CGP en migration (Gill et al., 2011). L'acquisition de la compétence gamétique se réalise dès 11 jpc chez la souris, et il semblerait que cela se déroule entre la 7^{ème} et la 9^{ème} SG chez l'Homme. Les cellules germinales sont alors appelées ovogonies dans l'ovaire et gonocytes dans le testicule.

Ainsi, cette étape constitue un changement en profondeur pour les cellules germinales et marque la fin de leur caractère pluripotent. A l'instar des cellules mésodermiques gonadiques, les CGP présentent la bipotentialité de s'engager vers la voie de différenciation mâle ou femelle, dépendamment de leur environnement somatique gonadique.

C) La différenciation femelle des CGP

Chez la femelle, la différenciation des cellules germinales va être marquée par l'entrée en méiose des cellules germinales rapidement après la fin de la colonisation de la gonade et l'acquisition de la compétence gamétique.

1) Initiation méiotique et méiose

L'entrée en méiose des ovogonies se fait sous l'influence de l'environnement somatique. Plusieurs équipes ont mis simultanément en évidence l'implication de l'acide rétinoïque (AR), un dérivé de la vitamine A, dans l'initiation méiotique (Baltus et al., 2006; Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Sécrété par le mésonéphros adjacent (et les cellules somatiques dans l'ovaire humain), l'AR va se complexer avec les récepteurs nucléaires de l'AR (RAR) présents dans les cellules germinales et induire directement l'expression du gène *Stimulated By Retinoic Acid 8* (*Stra8*) par les cellules germinales (Bowles et al., 2006). Même si l'implication de l'AR dans l'initiation méiotique est aujourd'hui sujet à controverses (Chassot et al., 2020; Kumar et al., 2011; Vernet et al., 2006), l'expression de *Stra8* est déterminante et est considérée comme le premier signe d'entrée en méiose chez la femelle. Celle-ci se fait dans l'ovaire fœtal de manière semi-synchrone et transitoire, selon un axe antéro-postérieur (Figure 7). Exprimé dès 12,5 jpc, *Stra8* est présent massivement à 14,5 jpc puis disparaît progressivement jusqu'à 16,5 jpc (Menke et al., 2003).

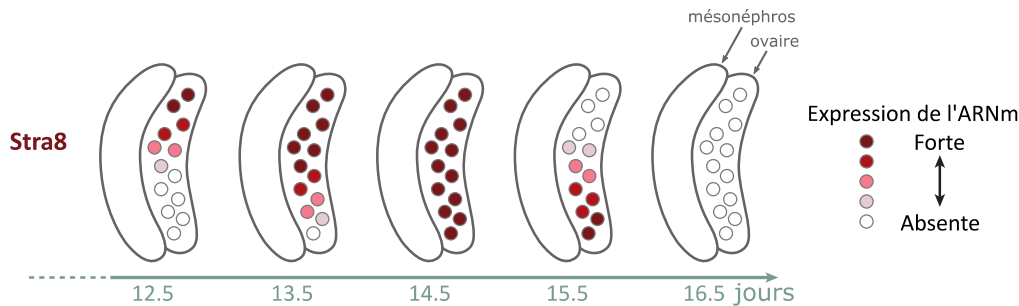


Figure 7. Cinétique de l'expression de l'ARNm de Stra8 dans l'ovaire fœtal murin.

L'acide rétinoïque produit par le mésonephros adjacent va contrôler l'expression de Stra8 dans l'ovaire fœtal. Stra8 est activé dès 12,5 jpc puis s'exprime selon l'axe antéro-postérieure avec un pic d'expression à 14,5 jpc. Elle disparaît ensuite progressivement à partir de l'entrée en méiose des cellules germinales. D'après Spiller, Koopman et Bowles (2017).

L'expression de *Stra8* va engendrer une cascade d'évènements régissant l'entrée en prophase I de méiose et sa progression comme l'expression de la *sporulation protein homolog 11* (SPO11) et DMC1, deux acteurs indispensables de la recombinaison homologue (Baltus et al., 2006; Menke et al., 2003).

Ainsi, dès 13,5 jpc chez la souris et entre 11 et 13 SG chez la femme, les ovogonies entrent en méiose. Le déroulement de la méiose sera abordé au chapitre I, D, 4. Nous retiendrons pour le moment que chez la femelle, la méiose est discontinue : les ovogonies s'arrêtent au stade diplotène de la prophase I de méiose, aux alentours de la naissance chez la souris, et vers 20 SG dans l'espèce humaine (Speed, 1982; Pour revue, MacLennan et al., 2015).

2) Rupture des nids ovigères

Comme évoqué précédemment, les ovogonies sont organisées en nid ovigères dans l'ovaire fœtal, ce qui est nécessaire à leur bonne différenciation et soutien leur entrée en méiose (Lei and Spradling, 2016). Toutefois, après le blocage des ovocytes en diplotène, ces amas cellulaires vont se fragmenter : on parle de rupture des nids ovigères. Les ovocytes vont alors s'associer individuellement aux cellules somatiques de la pré-granulosa afin de former les follicules primordiaux (Figure 8). La rupture des nids ovigères s'effectue en fin de vie fœtale chez la souris et entre la 17^{ème} et la 20^{ème} SG chez la femme, tandis que les premiers follicules primordiaux sont visibles à 1,5 jours post-partum (jpp) chez la souris (Motta et al., 1997).

Chez la souris comme chez l'humain, la rupture des nids ovigères implique une perte massive des cellules germinales par apoptose (Albamonte et al., 2008; De Pol et al., 1997; Ghafari et al., 2007; Pepling and Spradling, 2001). Environ deux tiers des cellules germinales seront perdus à ce moment-là (Pepling and Spradling, 2001). Ce mécanisme constitue donc probablement une étape de sélection clef où seuls les ovocytes présentant les « meilleures qualités » seront conservés. Il a été aussi montré

qu'une perturbation de ce processus, par exemple avec une exposition néonatale à des œstrogènes, induit la formation d'ovocytes sans assise somatique ou la persistance de ponts intercellulaires aboutissant à la formation de follicules multi-ovocytaires (MOF)(Iguchi et al., 1990; Jefferson et al., 2006).

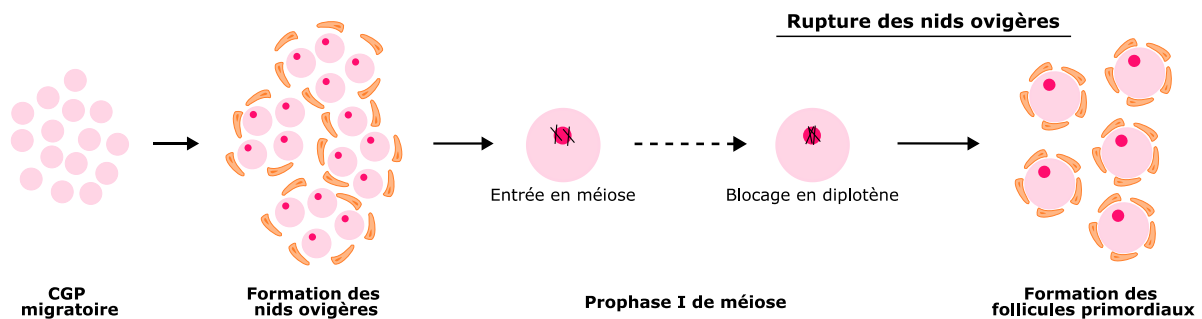


Figure 8. La rupture des nids ovigères.

Les cellules germinales primordiales (CGP) migratoires prolifèrent activement et sont entourées par les cellules de la granulosa pour former des nids ovigères. Elles entrent ensuite en méiose puis sont arrêtées au stade diplotène de la prophase I méiotique. Après cela, on assiste à la rupture des nids ovigères afin de former les follicules primordiaux, structure où chaque ovocyte est entouré par des cellules de la granulosa. Adapté d'Anderson et Telfer (2018).

3) La folliculogénèse

Le follicule primordial, c'est-à-dire un ovocyte arrêté en prophase I de méiose entouré d'une couche unique de cellules somatique aplaties, constitue l'unité fonctionnelle de base de l'ovaire. Ensemble, les follicules primordiaux des deux ovaires constituent ce que l'on appelle la "réserve ovarienne", c'est-à-dire le stock de follicules pas encore en croissance sur lequel repose la capacité de reproduction. La folliculogénèse est un processus continu et très sélectif, consistant à la maturation des follicules pour aboutir à un ovocyte compétent à la fécondation. Tous les follicules primordiaux n'entrent pas en croissance simultanément mais sont recrutés par petits groupes tout au long de la vie reproductive. La folliculogénèse comprend plusieurs étapes de différenciation germinale (modification de la morphologie et de la taille de l'ovocyte) et somatique (changement de la morphologie et du nombre de cellules autour de l'ovocyte) et repose sur un dialogue bidirectionnel entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent (Matzuk et al., 2002).

Tout d'abord, sous l'effet de signaux internes et externes à l'ovaire, plusieurs follicules primordiaux sont recrutés simultanément (Knight and Glister, 2006; McGee and Hsueh, 2000) et leurs cellules de la granulosa adoptent une forme cuboïdale : c'est la formation des follicules primaires (Figure 9). On observe également dans les follicules primaires, l'apparition de la zone pellucide, une matrice glycoprotéique entourant l'ovocyte et qui jouera un rôle primordial lors de la fécondation. Par la suite, les cellules de la granulosa se multiplient activement et s'organisent pour former différentes assises cellulaires autour de l'ovocyte. Celles-ci vont, de plus, être entourées d'un deuxième type de cellules somatiques, les cellules de la thèque. On parle de follicules secondaires. A partir de ce

moment-là, les cellules de la granulosa commencent à exprimer les récepteurs aux gonadotropines et à être sensibles à la *follicle stimulating hormone* (FSH) puis à la *luteinizing hormone* (LH) (Dewailly et al., 2016). Les cellules folliculaires continuent à proliférer et se mettent alors, sous l'action de la FSH, à sécréter un liquide appelé liquide folliculaire, jusqu'à former une cavité ou antrum (Abel et al., 2000). Dès l'apparition de cette cavité, on parle de follicules tertiaires ou antraux. Dès lors, les cellules somatiques de la granulosa et de la thèque collaborent afin de produire les stéroïdes ovariens (œstrogène et progestérone). Au niveau du follicule, le nombre de cellules folliculaires et la quantité de liquide folliculaire dans l'antrum ne cessent d'augmenter, poussant l'ovocyte sur un bord du follicule, entouré de sa zone pellucide et de quelques cellules folliculaires : le tout est appelé cumulus oophorus. A ce stade, on parle de follicule mature pré-ovulatoire ou de De Graaf. Finalement, suite au pic de LH, seul le follicule le plus sensible entamera une phase de maturation finale (maturation ovocytaire et expansion du cumulus) aboutissant au détachement du complexe cumulo-ovocytaire de la paroi du follicule et son expulsion : c'est l'ovulation (Park et al., 2004). L'ovulation est, de fait, l'exception dans la folliculogénèse, car plus de 99% des follicules vont régresser par atrophie tout au long du processus.

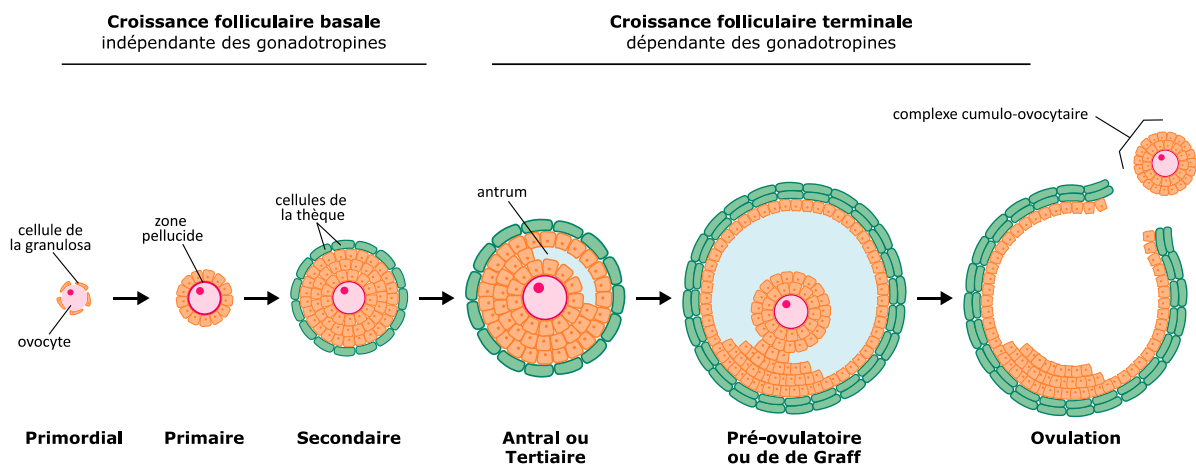


Figure 9. Étapes de la folliculogénèse et les différents types de follicules.

Les follicules primordiaux sont formés aux alentours de la naissance chez la souris et *in utero* chez l'humain. Dans les deux espèces, la croissance basale ne nécessite pas de stimulation par les gonadotropines. Les cellules de la granulosa entourant le follicule primordial vont adopter une morphologie cuboïdale et la zone pellucide va être produite par l'ovocyte ce qui va aboutir à la formation des follicules primaires. En parallèle de la prolifération des cellules de la granulosa, les cellules de la thèque viennent entourer l'ensemble pour former le follicule secondaire. À partir de la puberté, la FSH sécrétée par l'hypophyse favorise la prolifération des cellules de la granulosa qui se mettent à sécréter le liquide folliculaire jusqu'à former un antrum : on parle alors de follicule tertiaire ou antral. Le nombre de cellules folliculaires et la quantité de liquide folliculaire dans l'antrum ne cessent d'augmenter, cela va pousser l'ovocyte sur un bord du follicule et former le follicule pré-ovulatoire ou de de Graaf. Enfin, suite au pic de LH, le complexe cumulo-ovocytaire sera ovulé et les cellules somatiques restantes formeront le corps jaune. Adapté d'Edson et al. (2009).

De manière générale, le nombre total d'ovocytes formés en vie fœtale est déterminant et sera responsable de la capacité reproductive de l'individu adulte (Figure 10) (Bristol-Gould et al., 2006; Sun et al., 2017). En effet, les cellules germinales femelles ne connaissent qu'une seule phase de prolifération, en vie fœtale, interrompue par l'entrée en méiose, mais plusieurs phases de mortalité (rupture des nids ovigères, apoptose périnatale et atresie folliculaire). De plus, contrairement au testicule, l'ovaire adulte ne contient pas de cellules germinales souches. Ceci explique que la durée de fertilité chez la femelle, contrairement aux mâles, est limitée dans le temps et on comprend aisément que toute altération au cours de la différenciation fœtale des CG femelles aura un réel impact sur la quantité, et même la qualité, des ovocytes, et, à terme, sur la bonne fertilité des individus.

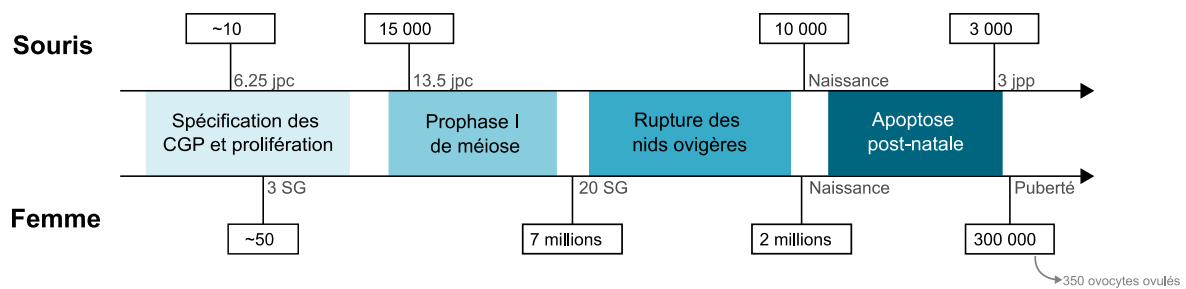


Figure 10. Nombre de cellules germinales dans l'ovaire chez la souris et la femme à différents âges.

Chez les mammifères femelles, les cellules germinales sont spécifiées précocement au cours du développement fœtal et vont proliférer activement jusqu'à leur entrée en méiose et vont être organisées en nids ovigères par les cellules de la granulosa. Une fois bloquées au stade diplotène de la prophase I méiotique, les nids ovigères seront rompus, processus qui implique une apoptose massive des cellules germinales qui va persister en période post-natale. jpc = jours post-coïtum; jpp = jours post-partum; SG = semaines de grossesse. Adapté de Sun et al. (2017).

D) La cellule germinale chez le mâle

Dans le testicule fœtal, les cellules germinales, nommées prospermatogonies après acquisition de la compétence gamétique, présentent une période de prolifération qui perdure plus longtemps que chez la femelle. Leur différenciation sera marquée par un arrêt mitotique.

1) L'entrée en quiescence

Principe général

A 13,5 jpc, les cellules germinales encore en cycle, couramment appelées prospermatogonies-M (M pour mitotique), commencent à exprimer les facteurs associés à l'arrêt du cycle cellulaire. Ce n'est qu'à 14,5 jpc chez la souris, que les prospermatogonies vont s'arrêter en phase G0/G1 du cycle mitotique : on parle d'entrée en quiescence mitotique et de prospermatogonies transitoires 1 (prospmatogonies-T1) (Li et al., 2017; McCarrey, 2013). L'entrée en quiescence chez le mâle, comme l'entrée en méiose chez la femelle, se fait de manière graduelle sur quelques jours. Cette phase va perdurer jusqu'aux environs de la naissance chez la souris.

Chez l'Homme, les cellules germinales vont réaliser la transition prospermatogonies-M vers prospermatogonies-T1 et, pour certaines, entrer en quiescence entre la 14^{ème} et la 17^{ème} SG. Toutefois, la différenciation dans les gonades fœtales humaines (testicule comme ovaire) n'est pas du tout synchrone. Ainsi, un mélange de prospermatogonies en cycle et quiescentes est observé dans le testicule fœtal humain et persistera tout au long de la vie fœtale et même en début de vie post-natale (Sasaki and Sangrithi, 2023).

Des études par séquençage sur cellules uniques ont décrit l'éventail transcriptionnel des testicules fœtaux humains (Guo et al., 2015; Li et al., 2017). On peut noter, dans les cellules germinales entrant en quiescence mitotique, l'expression de gènes liés à la spermatogenèse, parmi lesquels on peut citer ceux codant pour :

- des facteurs de transcription clefs : *zinc finger protein 267* (ZNF267), *FEZ family zinc finger 1* (FEZF1), *SRY-box transcription factor 12* (SOX12) et *DMRT like family B with proline rich C-terminal 1* (DMRTB1) ;
- les protéines *testis expressed 14* et *15* (TEX14 et TEX15), impliquées en mitose et en méiose ;
- la protéine à doigt de zinc NANOS2;
- *maelstrom spermatogenic transposon silencer* (MAEL), un répresseur des éléments transposables, indispensable au cours de la méiose ;
- et même une protéine de la spermiogenèse, *tudor domain containing 6* (TDRD6).

Cela signifie que les cellules se préparent déjà à la spermatogenèse future et laisse penser qu'une altération fœtale pourra conduire à des défauts germinaux après la naissance.

Mécanismes d'entrée en quiescence

Même si les mécanismes d'induction de la quiescence mitotique des cellules germinales mâles restent flous, Li *et al.*, par l'étude de l'environnement somatique dans des testicules fœtaux humains, proposent que cela serait la conséquence d'interactions bidirectionnelles entre les cellules germinales et somatiques, en particulier les voies de signalisation des BMP, des TGF- β et de NOTCH, sous l'influence de l'AMH sécrétée par les cellules de Sertoli (Li et al., 2017). Western *et al.* ont, de leur côté, décrit le mécanisme qui se déroule au sein des cellules germinales afin d'aboutir à l'arrêt mitotique. À 12,5 jpc, lorsque les cellules germinales sont encore en cycle rapide, elles présentent une hyperphosphorylation d'un régulateur essentiel du *checkpoint* G1-S : la *retinoblastoma protein* pRB. Dès réception des signaux somatiques, ils observent une augmentation de l'expression de deux inhibiteurs du cycle cellulaire, p27^{Kip1} et p16^{INK4b}, capables d'endiguer la phosphorylation de pRB par l'inhibition des complexes CyclinE-cdk2 et CyclinD-cdk4/6. Ainsi, une fois pRB hypophosphorylée, cela active le *checkpoint* du cycle cellulaire et conduit à l'arrêt mitotique entre G1/S dès 14,5jpc. Une fois

les cellules en quiescence, l'ARNm de pRB est dégradé et le maintien de la quiescence semble indépendant de pRB (Western et al., 2008). L'invalidation de pRB dans les cellules germinales mâles conduit à un retard d'arrêt mitotique (Du et al., 2021; Spiller et al., 2010). Etant donné que ce n'est qu'un retard, cela nous laisse penser que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans ce processus. Toutefois, cela permet surtout de mettre en exergue qu'une perturbation de la cinétique d'entrée en quiescence des prospermatogonies conduit non seulement à l'apoptose des cellules germinales, mais induit aussi une levée de l'inhibition de l'induction méiotique et une perturbation de la transition métabolique (Du et al., 2021), deux événements essentiels dans la vie des prospermatogonies et pour leur différenciation future.

La répression méiotique

Pour rappel, dans l'ovaire foetal, l'expression de l'acide rétinoïque induit, par l'expression de *Stra8*, l'entrée des cellules germinales en méiose. Dans le testicule, plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la prévention de l'initiation méiotique. Le plus couramment exposé est celui d'une enzyme, le *cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1* (CYP26B1), produite par les cellules somatiques environnantes et chargée de dégrader l'AR, bloquant ainsi l'initiation méiotique (Bowles et al., 2006; Kashimada et al., 2011; Koubova et al., 2006; MacLean et al., 2007). On peut aussi citer FGF9, issu des cellules de Sertoli, et NODAL (membre de la famille des TGF- β) qui agit de manière autocrine. Tous deux bloquent l'expression de *Stra8* et régulent à la hausse celle de *Nanos2* (Bowles et al., 2006; Frydman et al., 2017; Souquet et al., 2012).

La protéine de liaison à l'ARN *Nanos C2HC-Type Zinc Finger 2* (NANOS2) joue effectivement un rôle particulier dans la différenciation germinale. Plusieurs équipes ont montré, par des invalidations chez la souris, que NANOS2 est capable d'inhiber l'entrée en méiose dans les cellules germinales mâles en bloquant l'expression de *Stra8* via la dégradation de l'ARNm de DAZL, mais aussi que cette protéine est indispensable dans le maintien de la quiescence (Kato et al., 2016; Saba et al., 2014; Suzuki and Saga, 2008). NANOS2 serait aussi à l'origine d'un programme de différenciation mâle, ce qui a été confirmé par l'induction de l'expression de *Nanos2* dans des cellules germinales fœtales femelles : Suzuki et Saga ont observé, en plus de l'inhibition de la méiose, des modifications qui corrèlent avec ce qui est observé chez le mâle, au niveau de la morphologie des cellules germinales, par des immunomarquages, une diminution de la méthylation des histones (diminution de la marque H3K9me2) ainsi que l'expression de protéines spécifiques de la cellule germinale mâle (dont DNMT3L – cf. chapitre I, D, 5) (Saba et al., 2014; Suzuki and Saga, 2008). Plus récemment a été évoqué le mécanisme d'action de NANOS2 dans l'entrée en quiescence, médié par la répression post-transcriptionnelle d'une protéine, *Ras homolog enriched in brain* (RHEB), aboutissant à la suppression de l'activité du régulateur de croissance cellulaire mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Shimada et al., 2021).

Toutefois, il est important de noter que quelques cellules germinales mâles échappent à ce phénomène et, mon laboratoire comme d'autres, observent quelques cellules positives pour SYCP3 dans un testicule foetal sain (Yao et al., 2003).

Altération de l'entrée en quiescence

Il me paraît important d'insister sur le fait que l'entrée correcte des gonocytes en quiescence, autant sa chronologie que son bon déroulement, et quelle que soit l'espèce, est absolument indispensable pour assurer une vie reproductive correcte chez le futur individu adulte. En dehors d'une infertilité complète due à une mortalité massive par apoptose des cellules germinales comme cela a été observé chez les souris invalidées pour pRB ou NANOS2, une altération de la quiescence germinale peut être responsable d'un risque accru de développer des tératomes chez la souris (Heaney et al., 2012). Par ailleurs, une perturbation de gènes clefs mis en place à cette période tels que TEX14, TEX15 et TDRD6, est associé, chez l'humain à des azoospermies non obstructives et d'autres formes d'infertilité (Fakhro et al., 2018; Gershoni et al., 2017; Okutman et al., 2015; Sha et al., 2018).

2) Sortie de quiescence et différenciation

Principe général

Après plusieurs jours de quiescence mitotique, aux environs de la naissance chez la souris, les gonocytes vont se relocaliser dans le tube séminifère, subir une réactivation mitotique et se différencier : on parle de transition gonocytes-spermatogonies (Figure 11). Celle-ci concorde avec des changements morphologiques de la chromatine, associés à la mise en place d'un programme d'expression transcriptionnel et spécifique.

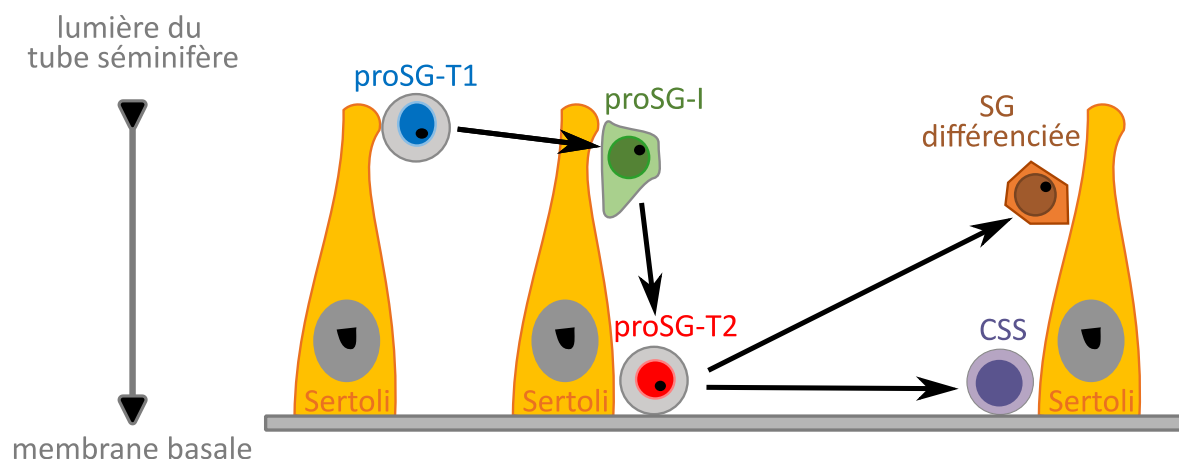


Figure 11. La transition gonocytes-spermatogonies.

Les prospermatogonies-T1 (proSG-T1) au centre des tubes séminifères se différencient en prospermatogonies-I (proSG-I). Ceux-ci vont migrer vers la lame basale et reprendre leur prolifération pour former des prospermatogonies-T2 (proSG-T2). Ces derniers ont deux destins possibles : 1/ la différenciation en spermatogonies (SG) différenciées qui participent à la première vague de spermatogénèse ; 2/ la différenciation en cellules souches spermatogoniales (CSS) qui nourrira la spermatogénèse sur le long-terme. D'après Tan et al. (2020).

Effectivement, les prospermatogonies T1 situées dans la lumière, au centre des tubes séminifères vont se relocaliser vers la membrane basale, le site de la niche spermatogonale naissante. On parle alors de prospermatogonies I (I étant pour intermédiaire), ayant un profil transcriptionnel qui leur est propre (Tan et al., 2020). Cette capacité des cellules souches à migrer pour trouver leur niche, s'appelle « homing » (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). La relocalisation des prospermatogonies à la périphérie des tubes séminifères est un évènement indispensable dans leur réactivation mitotique. En effet, les cellules germinales ne parvenant pas à migrer vers la périphérie des tubes séminifères sont éliminées ((Chen et al., 2015), preprint : Sun *et al.* 2023). Une fois relocalisées, il est supposé que ce sont des signaux émis par les cellules de la niche qui poussent les prospermatogonies-I à proliférer de nouveau : on parle alors de prospermatogonies transitoires 2 (prospermatogonies-T2). La reprise mitotique peut être repérée à l'aide de l'antigène Ki67, exprimé uniquement pendant les phases G1, S, G2 et M (et par conséquent, absent chez les prospermatogonies quiescentes).

Après reprise de leur prolifération, les prospermatogonies-T2, sont, contrairement à ce qui a été longtemps supposé, amenées à former deux populations cellulaires distinctes : 1/ les cellules souches spermatogoniales (CSS), *pool* fondateur sur lequel repose la spermatogenèse sur le long terme ; 2/ sans passer par l'étape CSS, des spermatogonies différenciées vont directement s'engager dans la première vague de spermatogenèse. Ces deux populations semblent distinguables par leur expression du facteur de transcription *Neurogenin-3* (NGN3), exprimé uniquement par les CSS (Yoshida et al., 2006)

Temporalité des évènements

La relocalisation à la lame basale et la différenciation ne sont pas synchrones pour toutes les prospermatogonies. On observe donc, dans le testicule en fin de vie fœtale comme en début de vie post-natale, différentes populations de cellules germinales, avec des vitesses de prolifération différentes (Law et al., 2019; Tan et al., 2020). La migration est initiée dès 18,5 jpc chez la souris (voire 16,5 jpc pour un tout petit nombre de cellules si on considère la protéine *inhibitor of DNA binding 4* – ID4, comme marqueur des CSS), et les premières prospermatogonies relocalisées commencent à proliférer à la naissance. Ainsi, la majorité des gonocytes a transité et est différenciée à 3,5 jpp tandis que les cellules engagées dans la première vague de spermatogenèse vont réaliser la méiose aux alentours de 10 jpp (Law et al., 2019; Nagano et al., 2000; Pui and Saga, 2017).

En ce qui concerne l'Homme, il existe plusieurs différences majeures en comparaison à ce qu'il se passe chez la souris. Guo *et al.* ont récemment montré que les prospermatogonies-T1 se différencient directement en spermatogonies indifférenciées, transcriptionnellement très proches, et sans passer par les phases intermédiaires observées chez la souris (Guo et al., 2021). De plus, le

« *homing* » semble avoir lieu en parallèle puisque les prospermatogonies-T1 sont situées à la lame basale des tubes séminifères dès la vie fœtale (Gaskell et al., 2004). Enfin, la première vague de spermatogenèse se fera après la puberté, à partir de la différenciation de CSS (Sasaki and Sangrithi, 2023). Certaines cellules germinales reprendront leur prolifération à partir de 8 semaines après la naissance (Culty, 2009).

Mécanismes dans le modèle murin

Les mécanismes impliqués dans la relocalisation, la reprise de prolifération et la différenciation des CSS restent encore mal connus et il n'est pas évident de les dissocier. Toutefois, Kanatsu-Shinohara et al. proposent, chez la souris, que les β 1-intégrines, récepteurs transmembranaires d'adhésion cellulaire, exprimés à ce moment-là par les cellules germinales comme les cellules de Sertoli, jouent un rôle essentiel dans le « *homing* » des prospermatogonies-I (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). L'importance de deux autres systèmes ligands/récepteurs dans la migration des gonocytes a été évoquée chez le rat, systèmes dans lesquels les gonocytes expriment les récepteurs et les cellules de Sertoli produisent les ligands. Ainsi, on a d'un côté le récepteur à tyrosine kinase c-KIT (*KIT proto-oncogene*) et son ligand le *stem cell factor* (SCF), et, de l'autre le récepteur *platelet-derived growth factor* (PDGF) *receptor β -subtype* (β -PDGFR), et ses ligands, PDGF-B et PDGF-D (Basciani et al., 2008; Orth et al., 1997).

En ce qui concerne la reprise de prolifération, Pui et Saga ont mis en évidence l'importance de la voie FGF. Pour cela, ils ont cultivé des testicules fœtaux (âgés de 17,5 jpc) de souris *ex vivo* en présence d'inhibiteurs de plusieurs voies de signalisation, dont les BMP, indispensables à la spécification des CGP. L'inhibiteur du FGF n'empêche pas la relocalisation des prospermatogonies à la lame basale mais bloque leur reprise de mitose et l'expression de différentes protéines clefs de la différenciation des CSS (Pui and Saga, 2017). Il semblerait que l'action du FGF soit médiée à la fois par la voie de signalisation *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) et par l'acide rétinoïque, tous deux synthétisés par les cellules de Sertoli, l'AR ayant déjà été montré comme jouant un rôle dans la différenciation spermatogoniales (Pui and Saga, 2017; Raverdeau et al., 2012; Vernet et al., 2006). Enfin, en plus de la reprise de prolifération, cette voie de signalisation semble être à l'origine de la relocalisation d'une protéine, *forkhead box O transcription factor 1* (FOXO1), présente jusqu'alors dans le noyau des gonocytes, et transloquée dans le cytoplasme (Pui and Saga, 2017), qui jouera un rôle dans l'auto-renouvellement des CSS. Nous pouvons enfin citer *Nanos2*, dont l'expression doit être finement régulée, sans quoi la reprise de prolifération, la relocalisation et l'expression des gènes spécifiques des CSS sont diminuées, sans pour autant altérer la relocalisation de FOXO1 (Pui and Saga, 2018) (Figure 12).

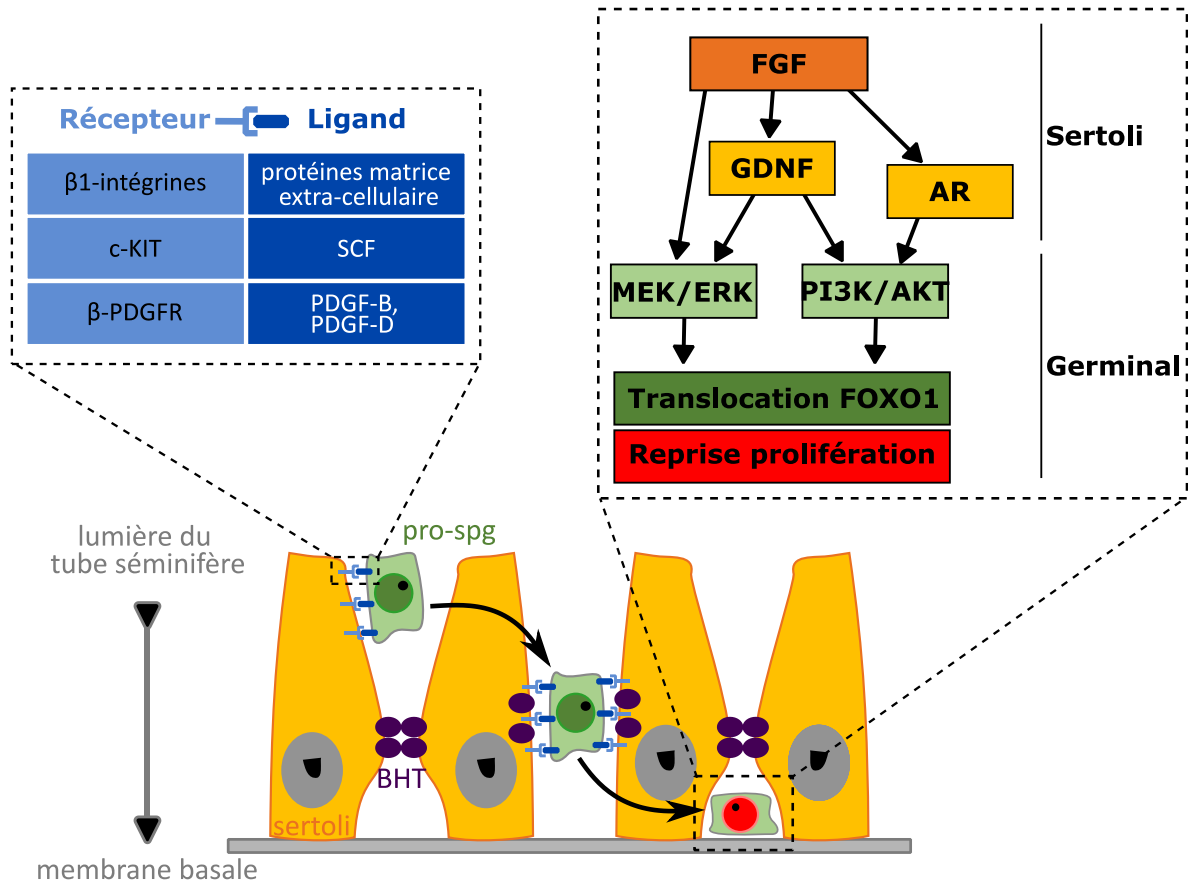


Figure 12. Mécanismes qui sous-tendent la relocalisation des prospermatogonies à la lame basale et leur reprise de prolifération.

La migration des prospermatogonies repose sur plusieurs interactions entre ligands exprimés par eux-mêmes et récepteurs exprimés par les cellules de Sertoli. Cela va leur permettre de se relocaliser depuis la lumière des tubes séminifères vers la membrane basale en traversant la barrière hémato-testiculaire (BHT). Une fois à la lame basale, l'expression paracrine des voies de signalisation du FGF, du GDNF et de l'acide rétinolique (AR) par les cellules de Sertoli vont induire la translocation de FOXO1 du noyau vers le cytoplasme dans les cellules germinales et induire leur reprise de prolifération.

Adapté de Pui et Saga (2017) et de Kanatsu-Shinohara et al. (2008).

Globalement, la sortie de quiescence des prospermatogonies et leur différenciation sont des événements complexes, indispensables, et fruits de la communication réciproque des cellules germinales et de Sertoli. Enfin, la propension des prospermatogonies à former le pool de CSS ou les progéniteurs de la première vague de spermatogenèse semble reposer sur des mécanismes épigénétiques encore mal connus à ce jour (Hermann et al., 2018, 2015).

Caractérisation des cellules souches spermatogoniales

Ainsi, toutes les étapes de la différenciation germinale mâle, depuis la spécification des CGP, avaient pour objectif d'aboutir à la formation de ces cellules souches spermatogoniales. Elles sont les garantes de la fertilité des individus mâles, tout au long de leur vie reproductive. Ainsi, le maintien des CSS est chaperonné par de nombreux facteurs, intrinsèques et extrinsèques aux cellules germinales. Ceux-ci ont fait l'objet d'un grand intérêt par la communauté scientifique, bien que les détails

mécanistiques soient encore flous (Pour revue, Wei et al., 2022). On peut citer le complexe de récepteurs GFR α 1/ RET (respectivement *GDNF family receptor alpha-1* et *RET: receptor tyrosine kinase*), effecteurs de la voie GDNF, et qui induisent, entre autres, l'expression d'ID4 ; la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ; les facteurs de transcription OCT4 et PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*), et NANOS2, aussi impliqué dans le maintien des CSS (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004; Liao et al., 2019; Naughton et al., 2006; Oatley et al., 2011; Sada et al., 2009; Takase and Nusse, 2016). La plupart de ces facteurs se régulent mutuellement et/ou agissent sur des cibles communes, formant des réseaux complexes pour assurer la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales (Song and Wilkinson, 2014; Wei et al., 2022). La plupart de ces facteurs nous sont utiles, en tant que scientifiques, afin d'identifier, autant chez l'humain que chez la souris, les spermatogonies les plus indifférenciées parmi les autres populations cellulaires testiculaires.

Dans le détail, les analyses par séquençage ARN sur cellules uniques (scRNA-Seq) indiquent qu'il existerait un ensemble continu de plusieurs sous-populations de spermatogonies indifférenciées, dans le testicule post-natal et adulte, chacune présentant des profils d'expression génique subtilement différents (Tan et al., 2020). Nous retiendrons surtout ici, leur double propriété de 1/ s'auto-renouveler continuellement et 2/ être capables de se différencier en progéniteurs de la spermatogenèse qui aboutira à la formation de spermatozoïdes. Évidemment, toute altération dans l'établissement ou le maintien du pool de CSS peut conduire à une infertilité ou au développement des cancers testiculaires d'origine germinaux.

3) La spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus de différenciation de gamètes mâles haploïdes, les spermatozoïdes, à partir des spermatogonies (cellules diploïdes). Elle comprend : 1/ la différenciation et le maintien des CSS, étape que je viens d'évoquer, 2/ la méiose et 3/ la spermiogenèse. Les populations de spermatogonies diffèrent légèrement entre la souris et l'Homme (Figure 13).

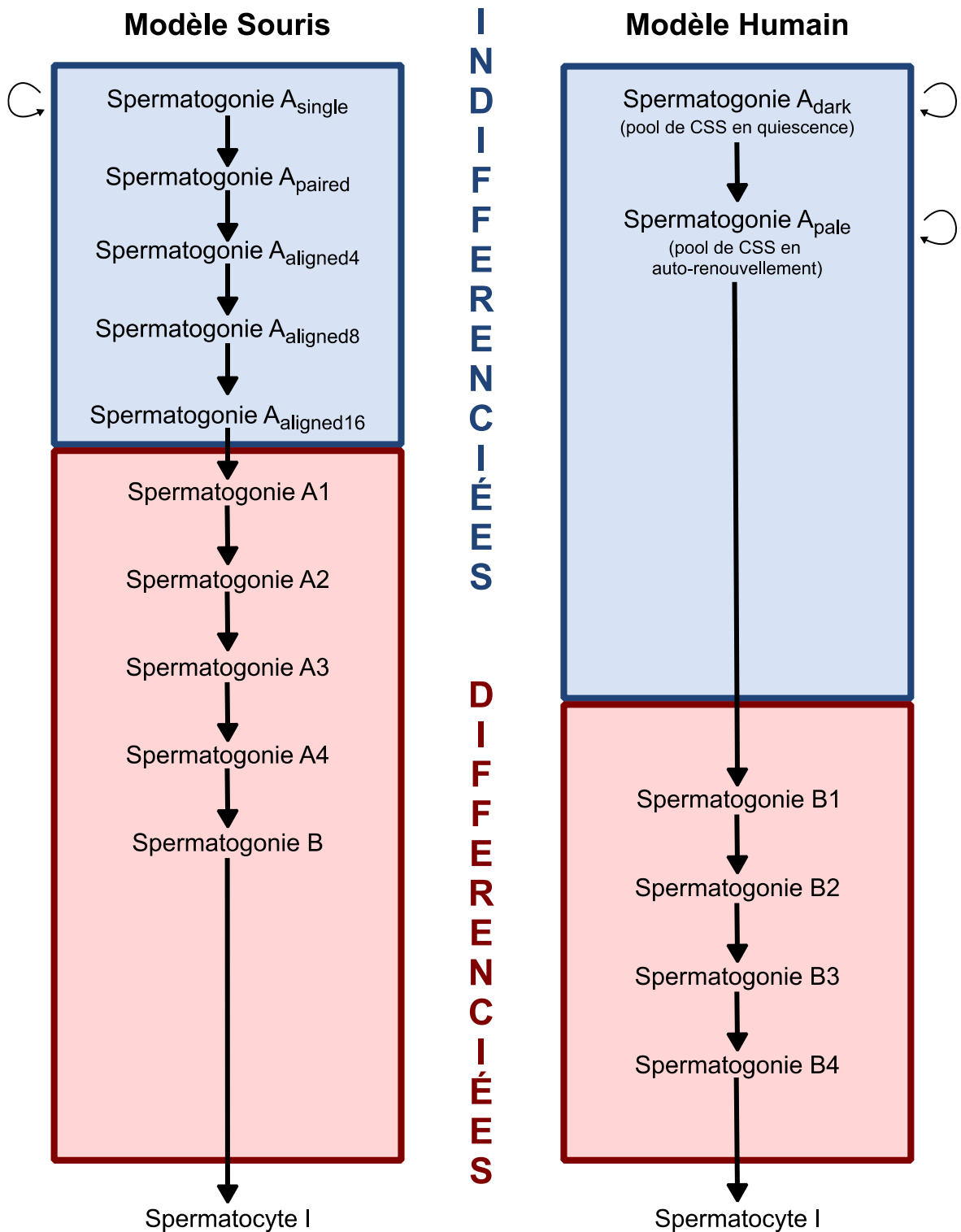


Figure 13. La division goniale chez l'homme et la souris.

Chez la souris, les spermatogonies indifférenciées A_{single} subissent 3 ou 4 divisions mitotiques pour donner naissance à des chaînes de clones cellulaires interconnectés par des divisions mitotiques incomplètes. Elles se différencient ensuite en spermatogonies différenciées A1 qui vont à nouveau réaliser 4 cycles de divisions mitotiques (spermatogonies différenciées A1-A4 et B) afin d'amplifier le stock de cellules entrant en méiose (spermatocytes I). Chez l'Homme, les spermatogonies indifférenciées A_{dark} et A_{pale} sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation afin de former les spermatogonies B. Celles-ci réalisent 3 divisions mitotiques (spermatogonies différenciées B1-B4) avant d'entrée en méiose. D'après la thèse de M. Givélet (2018)

Classification chez la souris

Chez la souris, nous retrouvons en premier lieu les cellules les plus indifférenciées et dont la prolifération est plutôt lente : les CSS ou spermatogonies A_s (pour *single*). Par division mitotique, celles-ci vont donner naissance à une paire de spermatogonies, appelées A_{pr} (pour *paired*) ou parfois spermatogonies transitoires, qui vont soit compléter la cytotinèse et produire deux nouvelles CSS, soit rester jointes et produire, après une nouvelle division, une chaîne de quatre spermatogonies, liées par des ponts intracytoplasmiques et nommées A_{al4} (dont *al* signifie *aligned*). Les spermatogonies A_{pr} et A_{al} sont parfois regroupées sous le terme de progéniteurs. Par division successives, on peut voir apparaître des chaînes de 8, 16 voire même 32 spermatogonies A_{al} . Ces groupes de cellules interconnectées issues d'une seule spermatogonie sont appelés des clones (Pour revue, Fayomi and Orwig, 2018). Les spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} forment ensemble la catégorie des spermatogonies indifférenciées et représentent environ 0,3% des cellules germinales du testicule de la souris adulte (dont 10% de ces spermatogonies indifférenciées sont les CSS/ A_s) (Tegelenbosch and de Rooij, 1993). Celles-ci expriment GFR α 1, ID4, PLZF, et NANOS2. Puis, ces cellules vont se différencier et successivement donner des spermatogonies A1, A2, A3, A4, Intermédiaire et finalement des spermatogonies B, toutes regroupées sous le terme de spermatogonies différenciées, et qui expriment DMRT1 (*Doublesex- and Mab-Related Transcription factor 1*), cKIT, NANOS3 et STRA8. Ce sont les spermatogonies B qui seront capables de continuer la différenciation et entrer en méiose. Toutes les spermatogonies, indifférenciée et différenciées, sont accolées à la membrane basale (Pour revue, Fayomi and Orwig, 2018).

Classification chez l'Homme

Chez l'Homme, il n'y a que deux types de spermatogonies indifférenciées, capable d'auto-renouvellement et de différenciation. Celles-ci ont initialement été décrites par Clermont *et al.* chez le macaque, puis ajustées chez l'Homme (Clermont, 1972; Clermont and Leblond, 1959) :

- Les spermatogonies A_{dark} , nommées ainsi du fait de leur hétérochromatine très condensée, présentent une faible activité de prolifération et sont considérées comme les cellules souches de réserve.
- Les spermatogonies A_{pale} , dont la chromatine est moins condensée, prolifèrent plus activement et sont capables de donner des spermatogonies B différenciées qui, comme chez la souris, entreront en méiose.

Gestion du stock

Dans le testicule humain, près de 22% des cellules germinales sont des spermatogonies indifférenciées (A_{dark} et A_{pale}), contre seulement 0,3% chez la souris. Cela provient du fait que le développement clonal des spermatogonies chez l'Homme présente 1 à 3 divisions mitotiques avant l'entrée en méiose, à l'inverse de la souris qui en présente jusqu'à 10. Ainsi, la production journalière de spermatozoïdes chez l'homme est d'environ 4,4 millions de spermatozoïdes par gramme de tissu testiculaire contre près de 40 millions de spermatozoïdes par gramme de tissu testiculaire et par jour chez la souris (Fayomi and Orwig, 2018).

La spermiogenèse

Après les divisions clonales, les spermatogonies B, cellules diploïdes ($2n$ chromosomes), vont entrer en méiose afin d'aboutir à la formation de spermatides haploïdes (n chromosomes). Cela sera détaillé dans le chapitre I, D, 5.

A l'issue de la méiose, les spermatides rondes vont réaliser la spermiogenèse, transformation fonctionnelle et morphologique indispensable pour obtenir des spermatozoïdes fonctionnels (Pour revue, Toshimori, 2003) (Figure 14). Rapidement, le noyau des spermatides va se polariser d'un côté de la cellule et sa chromatine se condenser grandement avec le remplacement des histones par les protamines, induisant un allongement caractéristique. En parallèle est formé l'axonème, pièce centrale du flagelle, constitué de microtubules ainsi que le manchon mitochondrial, qui fournira l'énergie nécessaire au déplacement du spermatozoïde. La spermatide allongée ainsi formée va alors se débarrasser de son cytoplasme et l'acrosome, réservoir enzymatique indispensable à la fécondation, va s'étendre jusqu'à recouvrir les $2/3$ du noyau. Le spermatozoïde ainsi formé pourra être libéré dans la lumière du tube séminifère : c'est la spermiation. Il cheminera ensuite dans les voies excrétrices en passant, dans l'ordre, par l'épididyme – indispensable car il va y acquérir sa capacité à féconder – puis le *vas déférent* et l'urètre, pour finalement être éjaculé avec le liquide séminal produit par les différentes glandes sur son trajet (majoritairement la vésicule séminale et la prostate). Des défauts au cours de la spermiogenèse peuvent entraîner des anomalies de la morphologie ou des compétences des spermatozoïdes (mobilité, motilité...) et surtout, réduire considérablement leur capacité de féconder un ovocyte (O'Donnell, 2014).

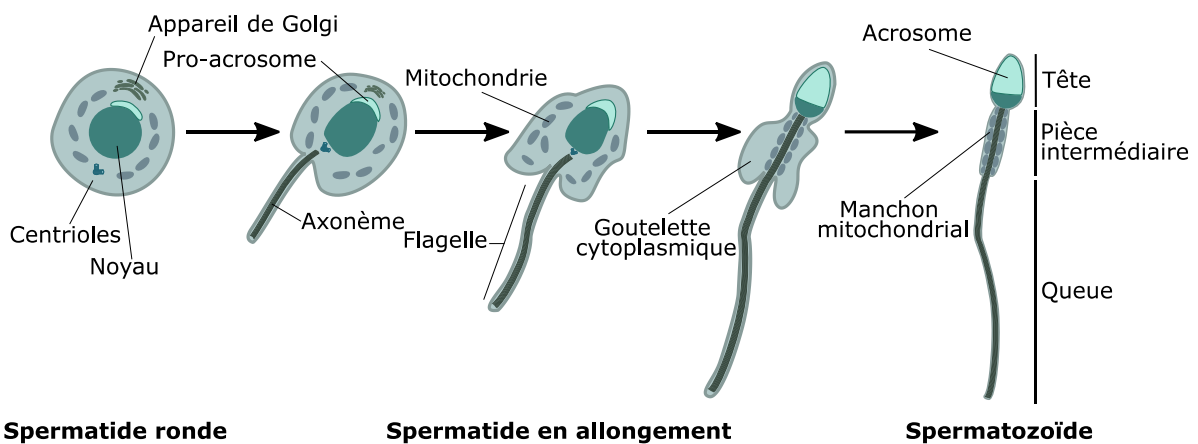
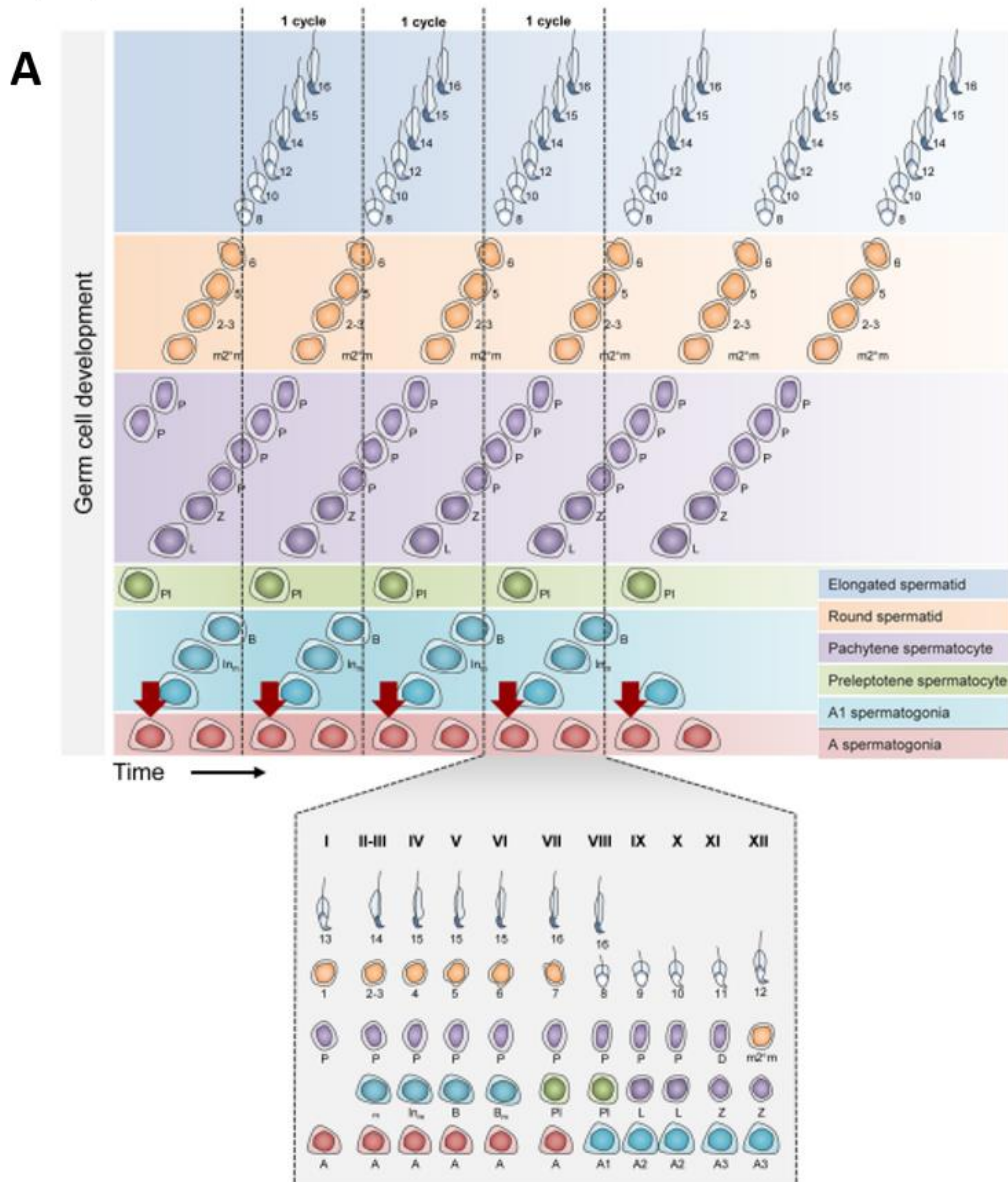


Figure 14. La spermiogenèse.

La spermiogenèse comporte quatre étapes réalisées simultanément afin d'aboutir à un spermatozoïde de forme allongé depuis une spermatide ronde : 1/ une réorganisation nucléaire avec condensation de la chromatine par le remplacement des histones par les protamines; 2/ la formation de l'acrosome, comprenant la migration de l'appareil de Golgi et la fusion des vésicules golgiennes afin de former l'acrosome; 3/ l'élongation du flagelle : le centriole distal s'allonge grâce aux microtubules pour former l'axonème et les mitochondries se réorganisent pour former un manchon autour de l'axonème ; 4/ l'élimination du cytoplasme en excès sous forme de gouttelettes cytoplasmiques appelées corps résiduels. D'après Mescher (2010).

Le cycle de l'épithélium séminifère

Chez les mammifères, à partir de la puberté et de façon cyclique, une nouvelle population de spermatogonies est recrutée, effectue les deux divisions de méiose sans interruption, puis, directement après, réalise la spermiogenèse : on parle de vague de spermatogenèse. Celle-ci dure 35 jours chez la souris ou 74 jours chez l'Homme et se déroule dans les tubes séminifères de manière centripète, c'est-à-dire que cette différenciation se fait de la lame basale vers la lumière du tube (Amann, 2008; Griswold, 2016). Ainsi, dans un tube séminifère, on observe empilement de cellules germinales à tous les stades de leur différenciation, par vagues de spermatogenèse. En histologie, nous retrouvons toujours les mêmes associations de cellules germinales : c'est le cycle de l'épithélium séminifère, décrit dès les années 1950 chez le rat (Leblond and Clermont, 1952) (Figure 15). Chez la souris, la spermatogenèse comprend 12 stades et 16 étapes de spermiogenèse, chez l'Homme, on compte 6 stades de spermatogenèse et 8 étapes de spermiogenèse (Mäkelä et al., 2020; Silber, 1984)).



B

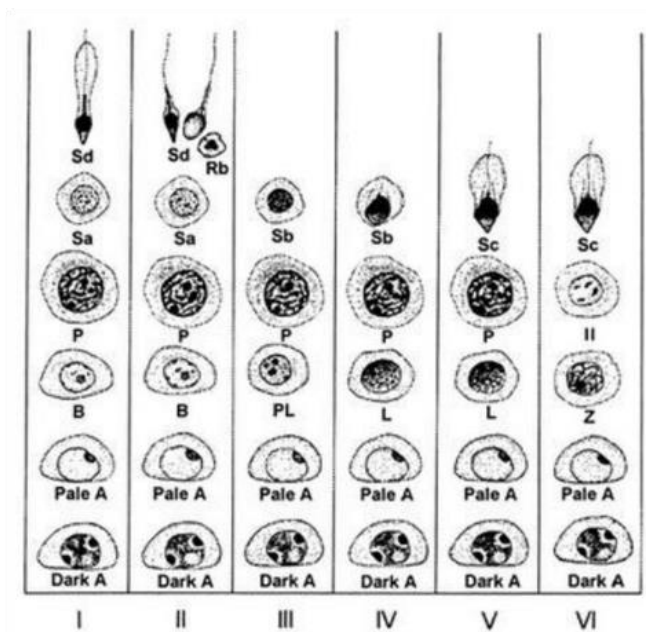


Figure 15. Cycles de l'épithélium séminifère chez la souris et chez l'Homme.

Au sein des tubes séminifères, les cellules germinales se différencient de façon centripète et on observe une succession régulière d'associations de cellules germinales appelé cycle de l'épithélium. Il comprend 12 stades chez la souris (A – tiré de Griswold (2016)) et 6 stades chez l'Homme (B – tiré de Silbert (1984)).

4) La méiose, spécificité du lignage germinal

Les cellules germinales ont la capacité, unique et primordiale, de réaliser la méiose. Ce processus, extrêmement conservé au cours de l'évolution, est une étape déterminante dans la gaméto-genèse. Elle consiste en deux divisions cellulaires successives précédées d'une unique phase de réplication de l'ADN (Figure 16). En plus de l'obtention de cellules haploïdes, la méiose permet le brassage de l'information génétique provenant des parents et donc d'aboutir à des cellules génétiquement uniques, ce qui est indispensable à la diversité des espèces. La méiose est une étape assez sensible aux perturbations, notamment aux polluants environnementaux, et des défauts au cours de la méiose peuvent induire une apoptose des cellules germinales, à la formation de gamètes aneuploïdes ou présentant des mutations, affectant ainsi la fertilité des individus (Pour revue, Bolcun-Filas and Handel, 2018; Handel and Schimenti, 2010; Ohkura, 2015).

La première division méiotique, dite division réductionnelle ou méiose I, permet la ségrégation des chromosomes homologues (d'origine paternelle et maternelle) : on obtient ainsi 2 cellules haploïdes ($1n$) à deux chromatides ($2c$). Elle contient quatre étapes :

- La prophase : étape la plus longue de la division méiotique, au cours de laquelle les chromosomes se condensent puis s'apparient par paire de chromosomes homologues. Ces bivalents vont réaliser des échanges intrachromosomiques de matériel génétique. En fin de prophase I, les microtubules constituant le fuseau méiotique se lient au centromère de chaque chromosome au niveau des kinétochores : on parle de prométaphase.
- La métaphase : les chromosomes homologues s'alignent de manière aléatoire au niveau du plan équatorial et forment la plaque métaphasique.
- L'anaphase : par l'allongement de la cellule et la contraction du fuseau, les bivalents se séparent et chaque chromosome homologue migre vers un pôle de la cellule. En fonction de l'agencement sur la plaque métaphasique, les chromosomes vont migrer vers l'un ou l'autre des pôles, pouvant aboutir à différentes combinaisons possibles : c'est le brassage interchromosomique.
- La télophase : après avoir formé les enveloppes nucléaires, la cellule se sépare en deux cellules filles par cytotodiérèse.

La deuxième division, dite équationnelle ou méiose II, voit les chromatides sœurs se séparer. Elle ressemble à une mitose classique, à l'exception de l'absence de prophase car la division équationnelle commence directement à la prométaphase II.

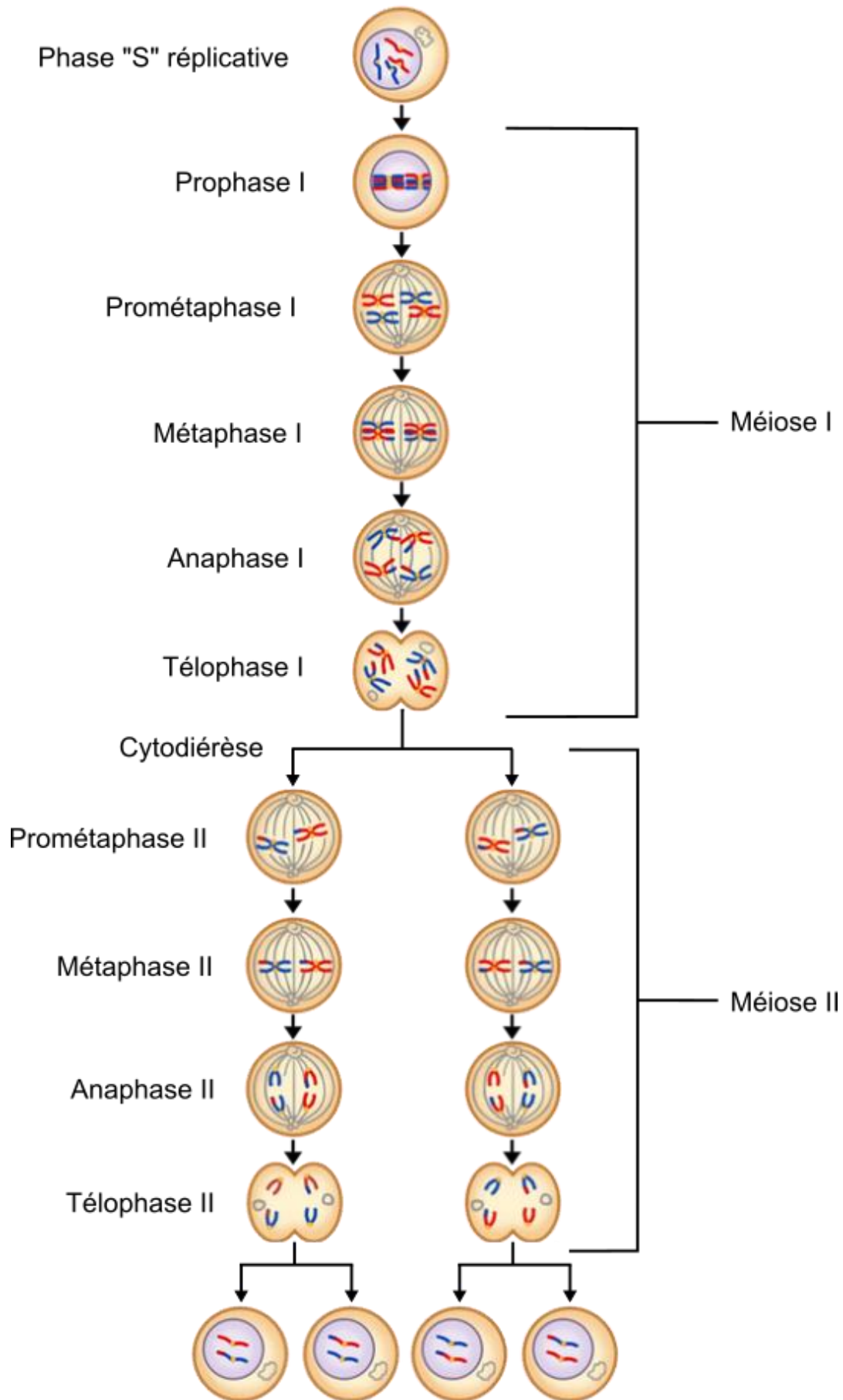


Figure 16. La méiose mâle chez les mammifères.

Les cellules germinales réalisent la méiose, une double division cellulaire précédée d'une phase unique de réplication. Chez le mâle, la méiose I ou division réductionnelle permet la ségrégation des chromosomes homologues et contient quatre phases : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télaphase. La méiose II, dite division équationnelle, permet la séparation des chromatides sœurs et aboutit à la formation de quatre spermatozoïdes. Elle ne comporte que quatre étapes puisqu'elle ne possède pas de prophase. Adapté de labster.com.

Il est important de noter que chez les mammifères, les méioses mâle et femelle diffèrent par plusieurs aspects : 1/ leur cinétique (durée, synchronicité), 2/ leur dynamique de progression (continue/discontinue) et 3/ le nombre de gamètes obtenus.

Comme évoqué précédemment, la méiose est initiée chez la femelle pendant la vie fœtale mais les ovogonies vont interrompre leur progression au stade diplotène de la prophase I. Cette phase de quiescence prolongée, aussi appelée vésicule germinative, va persister pendant plusieurs mois chez la souris et jusqu'à des décennies chez la femme. Suite à une stimulation hormonale, la reprise de méiose se fera à chaque cycle chez la femelle pubère. L'ovocyte achèvera alors sa première division méiotique (métaphase, anaphase, télophase) et expulsera le premier globule polaire, petite cellule abortive contenant la moitié du matériel génétique. L'ovocyte entamera immédiatement la deuxième division de méiose jusqu'à ce que l'ovocyte soit à nouveau bloqué, en métaphase II, jusqu'à sa fécondation (MacLennan et al., 2015). La méiose femelle est dite asymétrique puisqu'à partir d'une ovogonie ne sera formé qu'un seul ovocyte et deux globules polaires (Figure 17). Cela permet l'accumulation des réserves dans l'ovocyte, qui seront nécessaires au développement précoce de l'embryon.

Chez le mâle, contrairement à la femelle, la méiose est un processus continu se déroulant après la naissance, à partir de la puberté. Après divisions clonales, les spermatogonies B entrent en méiose afin d'aboutir à la formation de 4 cellules haploïdes à une chromatine ($1n, 1c$) appelés spermatides (Figure 17). Il est intéressant de noter que la première vague de méiose observée chez la souris mâle est unique en son genre, autant par le profil d'expression des spermatocytes, reflété au niveau protéique, que dans la régulation méiotique, et ne sera pas d'avantage détaillée dans ce manuscrit (Grive et al., 2019).

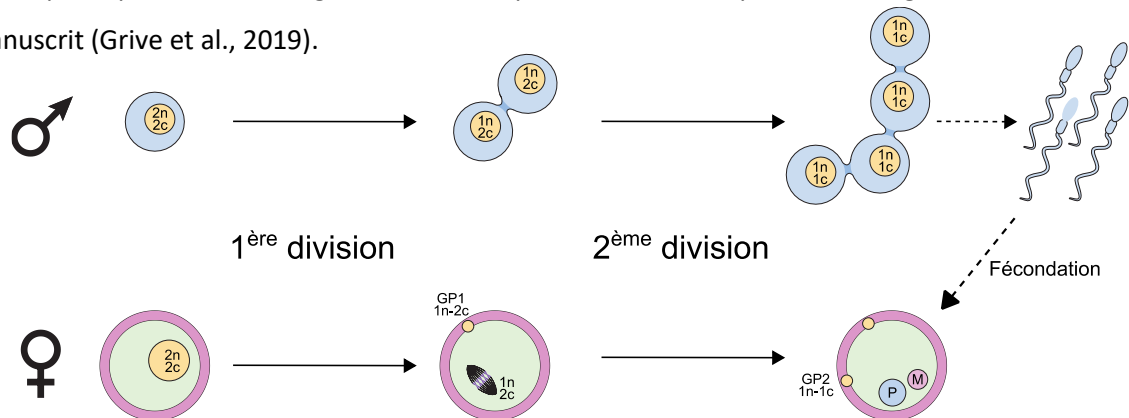


Figure 17. Comparaison de la méiose chez le mâle et chez la femelle.

Chez le mâle, la méiose permet, à partir d'une cellule contenant des paires de chromosomes ($2n$) à deux chromatides ($2c$), d'obtenir successivement deux spermatocytes à n chromosomes à $2n$ chromatides en fin de première division méiotique puis quatre spermatides à n chromosomes et n chromatide en fin de méiose, sans interruption dans le processus. Les quatre spermatides présentent un contenu cytotogique et une taille identique et formeront quatre spermatozoïdes après spermiogenèse. Chez la femelle, après la première division méiotique, l'ovocyte $2n2c$ formera un ovocyte et un globule polaire (GP1), différents par leur taille et leur contenu cytotogique mais possédant chacun $1n2c$ chromosomes. La prophase de première division méiotique est initiée pendant la vie fœtale chez la femelle et sera achevée qu'à partir de la puberté après une stimulation hormonale. La deuxième division méiotique chez la femelle n'est réalisée entièrement que si l'ovocyte est fécondé par un spermatozoïde et sera à nouveau asymétrique, avec formation d'un deuxième globule polaire (GP2 – $1n1c$) et de l'ovocyte II fécondé, le zygote. Les cellules germinales mâle sont représentées en bleu et celles de la femelle en rose. Adapté de Handel et Schimenti (2010).

La prophase I

Parmi toutes les étapes de la méiose, la prophase I a une importance particulière. Cette étape, finement régulée, s'étend sur 11 jours chez la souris mâle et jusqu'à 23 jours chez l'homme. On observe deux événements interdépendants : 1/ la génération de cassures double brin (CDB) de l'ADN, de manière programmée et leur réparation par recombinaison homologue (RH) ; 2/ la formation du complexe synaptonémal (CS) par alignement puis *synapsis* des chromosomes homologues. Cela aboutira à l'échange réciproque de matériel génétique permettant d'assurer la diversité génétique, et à la formation de liens physiques entre les chromosomes homologues, appelés chiasma, nécessaires pour obtenir une tension correcte sur la plaque métaphasique et une bonne ségrégation des chromosomes homologues. Les multiples événements qui ont lieu au cours de la prophase I de méiose sont tous très précisément orchestrés et intrinsèquement liés les uns aux autres. Ainsi, dans la majorité des cas, des défauts en prophase I de méiose conduit à une altération de la fertilité par apoptose germinale ou formation de gamètes aneuploïdes. La prophase I comprend 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

La recombinaison homologue

Comme évoqué dans le paragraphe dédié à l'initiation méiotique chez la femelle, *Stra8* joue le rôle d'orchestrateur de l'entrée en méiose, notamment au niveau de la phase de réplication pré-méiotique ou phase « S » pré-méiotique. A ce moment-là, en plus de la duplication du matériel génétique, la formation des futures CDB est programmée, en nombre, en espace et en temps. La méthyltransférase *PR domain-containing 9* (PRDM9) est capable de catalyser la tri-méthylation de la lysine 4 et ou 36 de l'histone H3 (respectivement H3K4me3 et H3K36me3) (Hayashi et al., 2005; Wu et al., 2013). PRDM9 va aussi être à l'origine d'une déméthylation locale de l'ADN induisant ainsi un enrichissement de la marque 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) autour du site de cassure (Y. Imai et al., 2020). Cet ensemble de marques épigénétiques vont permettre de signaler les points chauds de recombinaison, intervalles de 1 000 à 2 000 paires de bases où les CDB vont préférentiellement être formées, et vont permettre le maintien de l'ouverture chromatiniennne nécessaire à la réparation des CDB par RH (Paigen and Petkov, 2010).

Ainsi, au stade leptotène de la prophase I de méiose, et grâce à l'action de PRDM9, le complexe d'initiation de la RH contenant SPO11 sera recruté et activé, aboutissant à la formation de centaines de CDB (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997). Celles-ci seront immédiatement résectées (dégradation des terminaisons-5') pour aboutir à la formation d'extrémités simples brins d'ADN et seront signalisées par la phosphorylation de la lysine 139 du variant d'histone H2AX (γ H2AX) par deux kinases : *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) et *Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3-related* (ATR), ce qui favorise leur réparation. Ces kinases sont aussi chargées d'une régulation locale et a

posteriori du nombre et de la répartition des CDB sur les chromosomes (Carballo et al., 2013; Cooper et al., 2014). Cette phosphorylation, concomitante à la génération et à la réparation des CDB, permet de visualiser la progression de la prophase I méiotique par immunohistochimie.

Les extrémités simples brins d'ADN formées sont stabilisées par le complexe trimérique RPA (*replication protein A*) et son paralogue, le complexe MEIOB/SPATA22 (respectivement, *meiosis specific with OB-fold* et *spermatogenesis associated 22*) (Ribeiro et al., 2021, 2016; Souquet et al., 2013; Wang and Haber, 2004). Ces protéines seront progressivement remplacées par des recombinases, RAD51 (RAD51 recombinase) et son homologue méiotique DMC1, qui vont permettre l'invasion du chromosome homologue par recherche d'homologie (San Filippo et al., 2008). Cela aboutit à la formation d'une structure particulière, intermédiaire de la recombinaison, appelée *displacement-loop* (D-loop) (Waldvogel et al., 2019). Au sein de cette structure va avoir lieu une synthèse *de novo* d'ADN, en se servant du brin homologue comme matrice : on parle d'élongation de la D-loop. Pour résoudre cet intermédiaire de recombinaison, plusieurs voies sont possibles en fonction du devenir de l'autre simple brin d'ADN, résecté mais qui n'a pas envahi l'homologue (Pour revues, Baudat et al., 2013; Handel and Schimenti, 2010). J'ai choisi de vous détailler les deux principales.

Tout d'abord, la voie du non-*crossover* (NCO) où la D-loop est simplement résorbée et les cassures sont réparées par la voie du *Synthesis Dependant Strand Annealing* (SDSA). Celle-ci ne produit pas de chiasma mais peut donner lieu à un changement d'une petite séquence d'ADN par un phénomène appelé conversion génique (échange unidirectionnel et court, ayant un effet limité sur la diversité génétique).

L'autre possibilité est la voie du *crossover* (CO). La D-loop est stabilisée, la seconde extrémité cassée est capturée sur la D-loop puis étendue par synthèse d'ADN. Enfin, les extrémités sont liguées, ce qui aboutit à la formation de la double jonction de Holliday. Au stade pachytène, la double jonction de Holliday peut être dissoute sans former de CO ou résolue par l'activité endonucléasique du complexe MLH1/MLH3 (*MutL Homolog 1 et 3*) pour aboutir à la formation d'un *crossing-over*, c'est-à-dire un échange réciproque d'ADN sur un large intervalle de bras chromosomiques. Les chromatides sœurs restant connectées par les cohésines, le *crossing-over* permet la formation d'un lien physique entre les chromosomes homologues, visible en métaphase I sous la forme de chiasma.

L'ensemble de ces processus est résumé dans la figure 18.

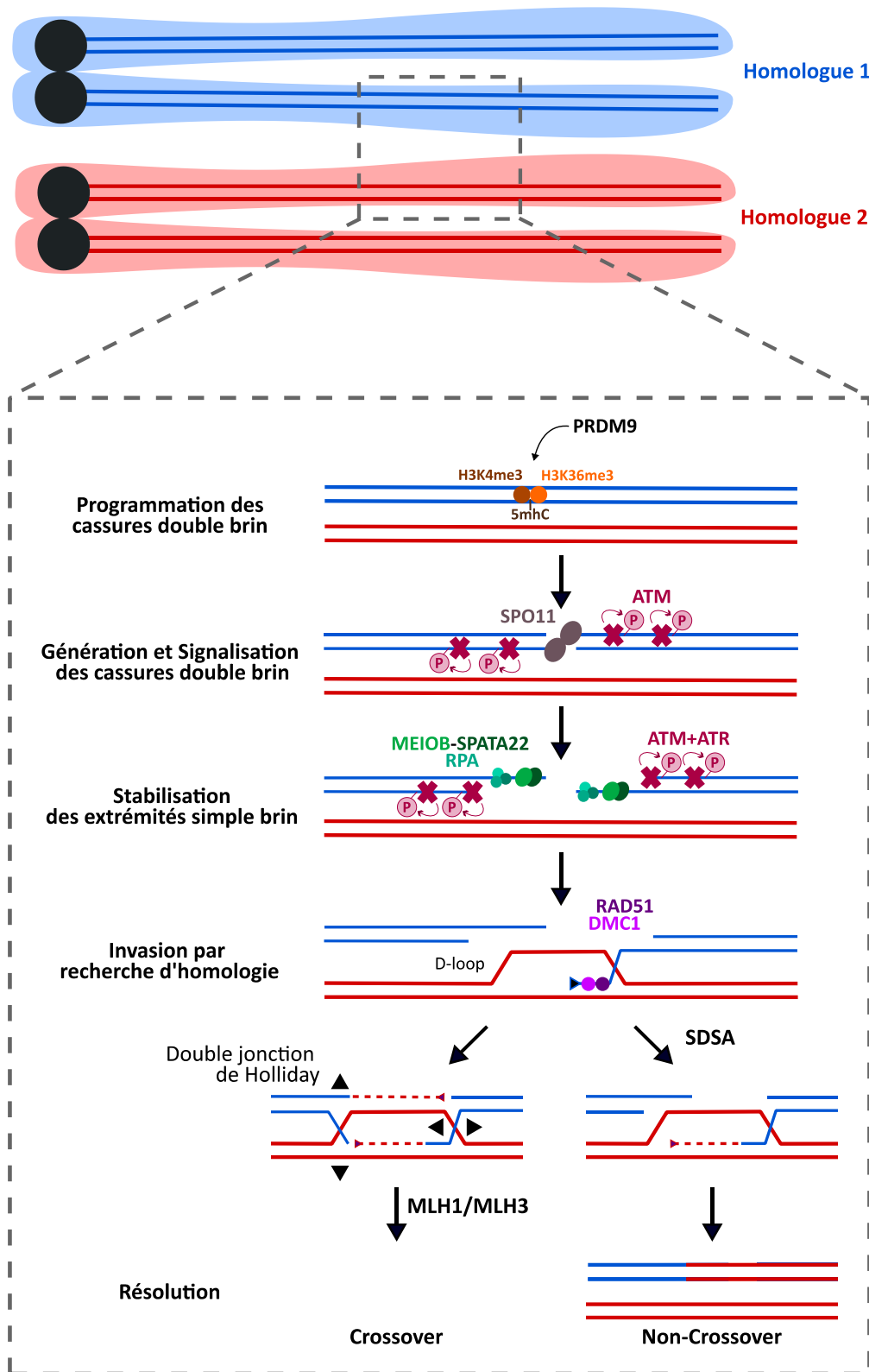


Figure 18. La recombinaison homologue.

PRDM9 est chargée d'apposer des marques épigénétiques afin de programmer les points chauds de recombinaison homologue. Ces marques seront reconnues par SPO11 qui génèrera des cassures double-brin de l'ADN et immédiatement signaler par la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX par ATM. Les extrémités simples brins sont résectées puis stabilisées par RPA et le complexe MEIOP/SPATA22. ATM est rejoint par ATR pour renforcer la signalisation. Les recombinaisons RAD51 et DMC1 vont remplacer les protéines de stabilisation de l'extrémité simple brin et vont envahir le chromosome homologue par recherche d'homologie. Cela aboutit à la formation de la D-loop. Celle-ci sera soit résorbée par la voie du SDSA sans formation de crossing-over, soit stabilisée et transformée en double jonction de Holliday qui sera résolue par le complexe d'endonucléases MLH1/MLH3. Cette voie pourra aboutir dans une partie des cas à la formation de crossing-over, lien physique entre les chromosomes homologues nécessaire pour la bonne ségrégation en métaphase. Adapté de Handel et Schimenti (2010).

La formation d'un CO est l'exception dans la résolution des CDB méiotiques. En effet, chez les mammifères, moins de 10% des CDB initialement formées aboutissent à la formation d'un CO (Girard et al., 2023). Toutefois, ces derniers sont absolument indispensables pour avoir une tension correcte lors de l'alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique et pour garantir leur bonne ségrégation en métaphase : on parle de « crossover obligatoire ». Chez les mammifères, on retrouve au moins un (si ce n'est deux) CO par bivalent. De ce fait, le nombre et la localisation des CO est un processus très finement régulé, et est sujet au phénomène d'interférence des CO, c'est-à-dire que la formation d'un CO empêche celle d'un autre CO à proximité (Girard et al., 2023).

Mise en place du complexe synaptonémal

En parallèle de la recombinaison homologue a lieu un autre évènement clef : l'appariement des chromosomes homologues avec la mise en place du complexe synaptonémal, favorisant la RH entre chromosomes homologues et non entre chromatides sœurs comme c'est le cas en mitose. En effet, au stade pré-leptotène, des complexes de cohésines permettent la condensation de l'ADN, formant un échafaudage pour initier l'assemblage des éléments latéraux du complexe synaptonémal qui relie les chromatides sœurs en leptotène. Au stade zygotène, les éléments latéraux, comprenant entre autres les protéines SYCP3 et SYCP2, s'allongent le long des chromatides sœurs pour former les axes latéraux et sont ensuite réunis par la mise en place des éléments transverses dont SYCP1, puis des éléments centraux dont les trois *synaptonemal complex central element protein* (respectivement SYCE1, SYCE2 et SYCE3) (Figure 19). Cette proximité autorise les chromosomes homologues à s'apparier entre eux pour la RH. Au stade pachytène, cet appariement, aussi appelé *synapsis*, est complet sur toute la longueur des axes chromosomiques, à l'exception des gonosomes (chromosomes sexuels), non homologues, qui ne sont appariés qu'au niveau de la région pseudo-autosomale. Enfin, au stade diplotène, le CS est désassemblé, les chromosomes homologues ne sont plus appariés et restent joints uniquement par les chiasmata. Des altérations de l'appariement des chromosomes, ou *asynapsis*, sont presque toujours associées, chez le mâle, à l'apoptose de spermatocytes au stade pachytène et/ou au stade métaphase de la première division méiotique, et conduit, chez l'humain comme dans des modèles murins, à des problèmes de fertilité (Burgoyne et al., 2009; Cohen et al., 2006; Vincent et al., 2002).

Ainsi, ces deux mécanismes, la recombinaison homologue et la mise en place du complexe synaptonémal sont interdépendants et présentent des mécanismes de régulation mutuelle. Les individus déficients pour un gène du CS présentent généralement des altérations de RH et inversement. De manière globale, une altération à un moment donné de la prophase I entraîne souvent une cascade de conséquences, ce qui rend parfois difficile l'identification des causes et des conséquences en recherche fondamentale.

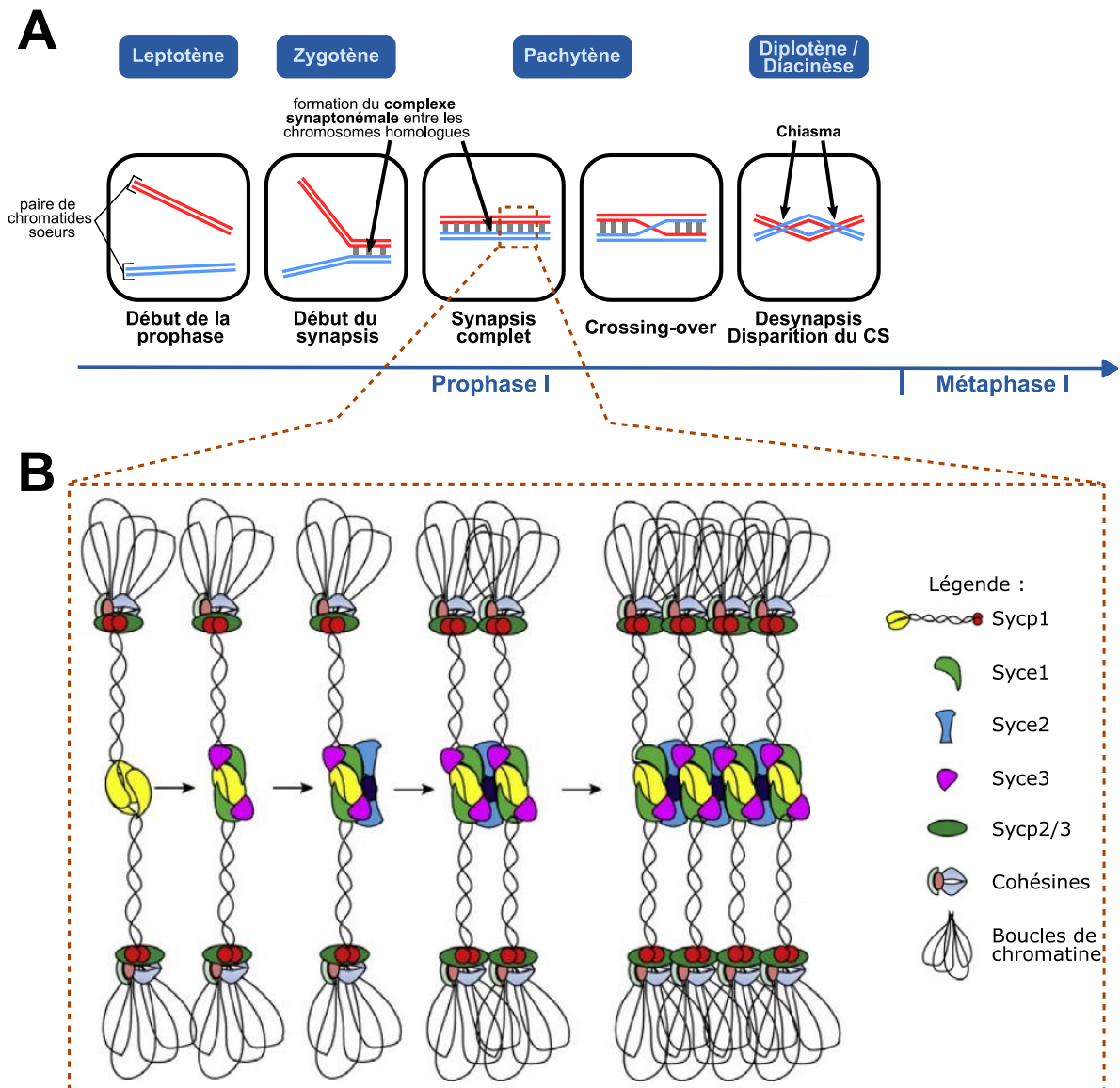


Figure 19. Le complexe synaptonémal.

A) L'ADN se condense au stade pré-leptotène/leptotène grâce à des complexes de cohésines. En zygotène, les éléments latéraux et transverses se mettent en place et initient le synapsis. Au stade pachytène, le synapsis est complet sur toute la longueur des chromosomes ce qui autorise la recombinaison homologue et aboutit à la formation de crossing-over. Le complexe synaptonémal est désassemblé au stade diplotène. Adapté de Hosoya et Miyagawa (2021). B) Le complexe synaptonémal complètement assemblé forme une structure tripartite qui lie les chromosomes homologues. Les éléments transverses SYCP1 joignent les éléments latéraux SYCP2/3 déposés le long des axes des boucles des chromatides sœurs de chacun des chromosomes homologues. Les éléments centraux tels que SYCE1, SYCE2 et SYCE3 se déposent progressivement pour former l'élément central qui stabilise l'appariement des chromosomes homologues. Adapté de Bolcun-Filas et Schimenti (2012).

5) La régulation épigénétique de la différenciation germinale et de la méiose

Le terme épigénétique regroupe les mécanismes permettant de moduler l'expression génique sans modification de la séquence d'ADN elle-même. Généralement, on distingue trois marques, héréditaires et réversibles : 1/ la modification des bases de l'ADN, dont la plus connue est la méthylation des cytosines ; 2/ les modifications post-traductionnelles des histones, notamment leur méthylation, acétylation, ou phosphorylation et 3/ les ARN non codants, dont l'action ne passera pas par leur traduction en protéines. Chaque étape de la différenciation germinale précédemment décrite, depuis la vie fœtale jusqu'à la production des gamètes, repose au moins en partie, sur des remaniements épigénétiques divers, en inter-coopération étroite avec l'expression transcriptionnelle de programmes précis. Certaines étapes telles que la transition pluripotente/différenciation, l'initiation et la progression méiotique nécessitent des remaniements épigénétiques spécifiques. Ainsi, toute altération épigénétique, et notamment dans les dynamiques de méthylation de l'ADN, peut avoir de graves conséquences à court et/ou à long terme sur la vie de la cellule germinale, pouvant même conduire à sa mort et donc à une infertilité de l'individu (Odronec et al., 2023). Vous trouverez dans ce chapitre, les principales modifications épigénétiques qui sous-tendent la différenciation germinale mâle chez la souris, et en particulier les modulations de la méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN résulte du transfert d'un groupement méthyle sur le cinquième carbone du résidu cytosine. Cela est effectué par une famille d'enzyme, les *ADN methyltransferases* (DNMT), et aboutit à la formation d'une 5-méthylcytosine (5mC) (Jang et al., 2017; L. D. Moore et al., 2013) (Figure 20A). Cette marque épigénétique, extrêmement conservée des plantes aux animaux, est dynamique et impliquée dans de nombreux processus de différenciation cellulaire.

En fonction de son emplacement dans l'ADN, le rôle de la méthylation sera légèrement différent. Au niveau des régions intergéniques, dont les séquences répétées, la méthylation de l'ADN est responsable de la répression des éléments transposables et viraux, potentiellement dangereux s'ils sont exprimés (Schulz et al., 2006). Cependant, la majorité des 5mC se situent dans les îlots CpG, régions d'approximativement 1000 paires de base où ~75% des cytosines sont méthylées (Figure 20B). Les îlots CpG sont majoritairement retrouvés dans les régions géniques, et en particulier au niveau des séquences promotrices, ce qui permet une régulation de l'expression génique. De fait, l'état de méthylation est spécifique de la cellule et de son état de différenciation. Lorsque les îlots CpG hyperméthylés sont situés dans le corps d'un gène, ils vont induire une augmentation de son expression (Yang et al., 2014). *A contrario*, l'hyper-méthylation des îlots CpG localisés au niveau d'un site promoteur d'un gène, entraînera sa répression transcriptionnelle et permettra la compaction de région d'ADN en hétérochromatine (Chodavarapu et al., 2010; Jang et al., 2017).

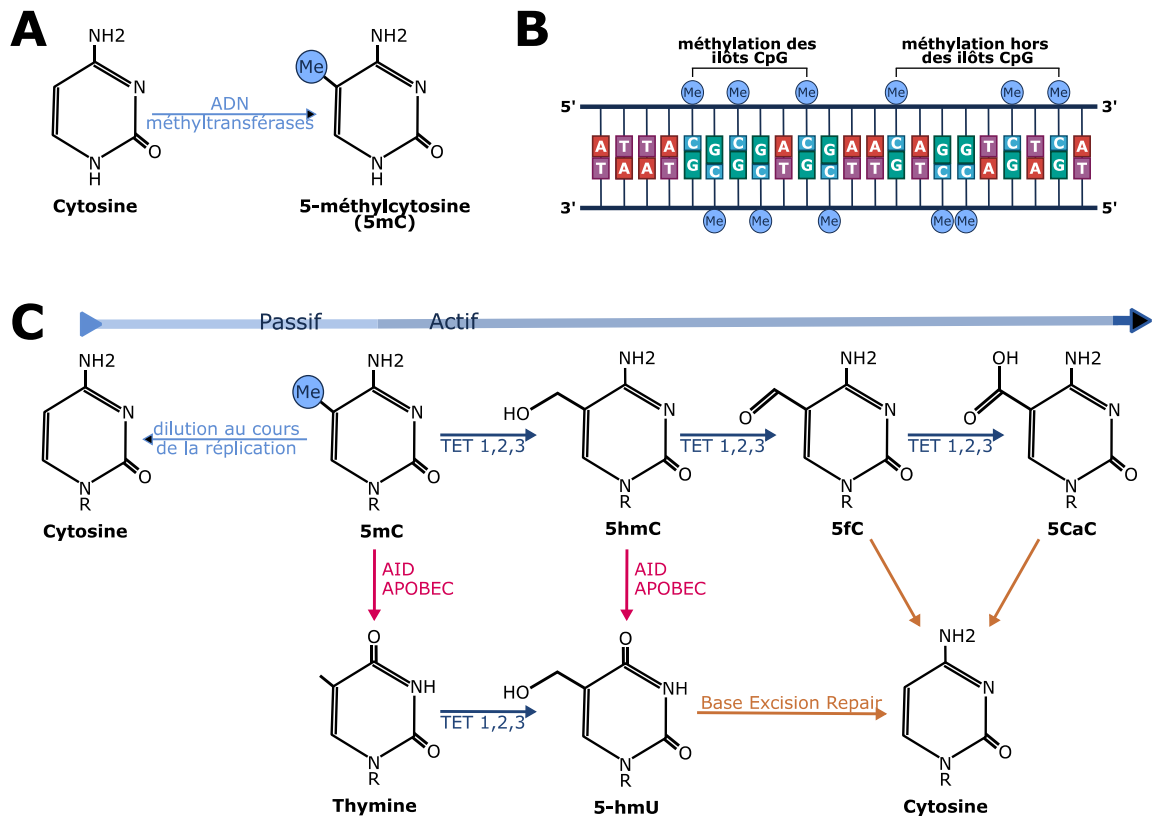


Figure 20. La méthylation et la déméthylation de l'ADN.

A) La méthylation de l'ADN se produit au niveau du cinquième carbone de la cytosine et conduit à la formation de 5-méthylcytosine (5mC). B) la méthylation de l'ADN est principalement observée sur les sites CpG et beaucoup plus rarement sur les sites non-CpG. C) la 5mC peut être déméthylé de manière passive au cours de la réplication. La déméthylation active de l'ADN peut se produire par oxydation où les enzymes TET convertissent successivement la 5mC en 5hmC, 5fC et 5caC. La 5mC et la 5hmC peuvent aussi être désaminées grâce au complexe AID/APOBEC qui les transforme respectivement en thymine et en 5-hmU. La 5fC, la 5caC et la 5hmU sont excisées puis remplacée par la voie du BER. D'après Jang *et al.* (2017).

Chez les mammifères, on dénombre trois méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. Toutes sont exprimées au cours de la gamétogenèse, DNMT1 étant impliquée dans le maintien de la méthylation en réplication, tandis que DNMT3A et DNMT3B sont préférentiellement en charge de la méthylation *de novo*, en étroite collaboration avec une protéine chargée de leur régulation : DNMT3L (*DNA methyltransferase 3-like*), qui ne possède pas de domaine catalytique (Uysal *et al.*, 2016).

A l'inverse, la méthylation de l'ADN peut être effacée. Cela peut se faire de manière passive, au cours de la réplication et en l'absence de réapposition de la méthylation sur le brin nouvellement synthétisé, ou de façon active, par l'intervention de différentes enzymes capables de la désamination ou de l'oxydation des cytosines (Figure 20C). L'action conjointe de l'*activation induced cytidine deaminase* (AID) et de l'*apolipoprotein B mRNA editing enzyme* (APOBEC) conduit à la désamination de la 5mC en thymine, ce qui produit un mauvais appariement T-G et sera finalement réparé par le *Base Excision Repair* (BER). La principale voie de déméthylation active est réalisée par oxydations successives des 5mC par les trois protéines *Ten-Eleven-Translocation* (TET), ce qui conduit à la

formation de 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) puis de 5-formylcytosine (5fC) et enfin de 5-carboxylcytosine (5caC), ces deux derniers pouvant être remplacés par une cytosine grâce au BER (Zhang et al., 2023). Chacun des trois produits d'oxydation de la 5mC sont mal reconnus par DNMT1, participant ainsi à la déméthylation passive de l'ADN. Enfin, il est intéressant de noter que la 5hmC n'est pas seulement un intermédiaire de déméthylation mais peut être reconnue par des régulateurs transcriptionnels spécifiques, notamment au cours de la neurogénèse, participant de fait à la régulation de l'expression génique et au contrôle de l'identité cellulaire (Kharat and Sharan, 2020; Sun et al., 2014).

La différenciation germinale est intimement liée à d'importants remaniements au niveau de la méthylation de son ADN, à l'échelle globale ou de manière précise et localisée, résumés en figure 21 et que nous allons maintenant détailler.

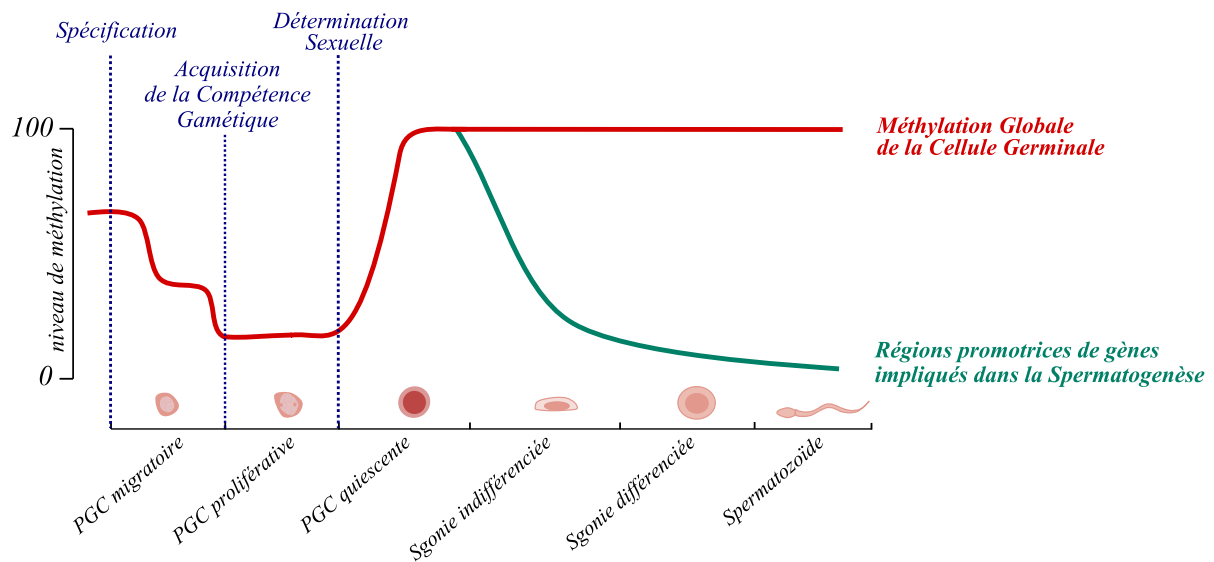


Figure 21. Les remaniements de la méthylation de l'ADN au cours de la différenciation des cellules germinales mâles.

Juste après leur spécification, les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation quasi-globale de leur génome au cours de leur migration. Celle-ci est d'abord passive, par dilution de la méthylation au fil des divisions, puis facilitée par les enzymes TET. Après la détermination sexuelle, les cellules germinales quiescentes voient leur ADN être complètement reméthylé par DNMT3A majoritairement. Après la naissance, une déméthylation spécifique autorise la transition gonocyte-spermatogonie et la suite de la spermatogénèse.

Les cellules germinales primordiales

Indépendamment de la déméthylation globale qui s'est produite au cours du développement embryonnaire précoce, les CGP subissent, après leur spécification, une reprogrammation à l'échelle du génome à un état épigénétique basal, effaçant les marques de méthylation des génomes parentaux puis en apposant de nouvelles, différentes dans les gamètes mâles et femelles, notamment au niveau des gènes soumis à l'empreinte (Pour revue, Saitou et al., 2012). Ces marques épigénétiques garantissent l'expression mono-allélique spécifique de plus d'une centaine de gènes chez les mammifères.

Ainsi, à la suite de leur spécification et dès 7,5 jpc, l'ADN des CGP subit une déméthylation quasi globale de leur génome, et dans toutes les régions : promoteurs, introns, exons, séquences intergéniques. Ainsi, plus de 70% des îlots CpG sont méthylés dans les CGP après spécification, et ce chiffre sera réduit à environ 10% dans les gonocytes à 13,5 jpc (précisément 15% dans les CG mâles et 7% dans les CG femelles) (Popp et al., 2010; Seisenberger et al., 2012). Dans un premier temps, la déméthylation est passive, associée à la réplication rapide des CGP, amplifiée par une absence de méthylation *de novo* et une maintenance de la méthylation de l'ADN sélective (Arand et al., 2015; Hargan-Calvopina et al., 2016; Kagiwada et al., 2013). Cela est responsable de la majorité de la déméthylation puisqu'à 9,5 jpc, les CGP présentent un niveau de méthylation aux alentours de 30%. A partir de l'entrée de CGP dans la gonade, la déméthylation sera facilitée par l'action des enzymes TET et du complexe AID/APOBEC, et semble plus sélective (Popp et al., 2010; Yamaguchi et al., 2012). Un des régulateurs principaux de cette étape, au moins chez la souris, est la protéine *PR-domain containing protein 14* (PRDM14), impliquée à la fois dans la répression transcriptionnelle des DNMT et dans le recrutement des protéines TET (Seki, 2018). Cette déméthylation est probablement responsable, ou au moins accompagnée, par des changements drastiques de l'état de la chromatine, y compris des remplacements d'histones et de leurs modifications post-traductionnelles (Saitou et al., 2012; Seki et al., 2005). Ainsi, le remaniement global de l'épigénome des CGP, et en particulier la déméthylation de l'ADN, est strictement nécessaire pour l'extinction du programme transcriptionnel somatique, la ré-acquisition des facteurs de pluripotence et l'acquisition de la compétence gamétique, et donc, plus généralement, est indispensable pour avoir une différenciation germinale correcte (Hargan-Calvopina et al., 2016; Maatouk et al., 2006; Saitou et al., 2012). Harvan-Calvinopa *et al.* ont d'ailleurs montré que la déficience de DNMT1 induit une différenciation germinale précoce et des altérations de l'expression génique, ce qui aboutit à une perte massive des cellules germinales, chez le mâle comme chez la femelle. De la même manière, l'inactivation de *Tet1* ou l'absence d'un de ses cofacteurs conduit à une diminution du nombre de cellules germinales et à des altérations de la

fertilité, par inhibition de l'expression de régulateurs méiotiques et des anomalies en méiose (DiTroia et al., 2019; Yamaguchi et al., 2012)

La méthylation de novo de l'ADN

L'effacement de la méthylation permet de faire de la place pour une nouvelle programmation épigénétique. En fonction du sexe de l'individu et après la détermination sexuelle, les cellules germinales adopteront une méthylation qui leur sera propre et selon des chronologies distinctes. Chez la femelle, l'état hypométhylé persistera jusqu'après la naissance et l'apposition *de novo* de la méthylation se fera dans l'ovocyte en dictyate, en parallèle de la croissance folliculaire, et l'avancement de l'apposition de la méthylation semble corrélée avec la taille de l'ovocyte et non l'âge de la souris (Hiura et al., 2006; Lucifero et al., 2004; Seisenberger et al., 2012).

Chez le mâle, la méthylation *de novo* de l'ADN commence plus précocement, dans les gonocytes en quiescence, et sera réapposée prioritairement au niveau des éléments transposables. La majorité de la méthylation sera établie à la naissance, alors que la méthylation complète des empreintes paternelles ne sera finalisée que pendant la puberté. L'apposition *de novo* de la méthylation de l'ADN dans les prospermatogonies est majoritairement réalisée par DNMT3A, soutenue et activée par DNMT3L. De son côté, DNMT3B, aussi en étroite collaboration avec DNMT3L, semble impliquée uniquement dans la reméthylation du gène *Rasgrf1* (*RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1*) et certaines séquences répétées (Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007). De la même manière, DNMT3B semble avoir un rôle mineur dans la reméthylation de l'ADN chez la femelle (Shirane et al., 2013).

De manière générale, la méthylation *de novo* de l'ADN dans les cellules germinales sera conservée jusqu'à la fin de la gamétogenèse et même bien au-delà de la fécondation pour les gènes soumis à l'empreinte parentale. Son apposition correcte régit, chez le mâle, la suite de la vie de la cellule germinale, et notamment l'obtention de CSS compétentes (Dura et al., 2022). Chez la femelle, seulement 40% des îlots CpG de l'ADN de l'ovocyte seront méthylés lors de l'ovulation, régionalisés à certains domaines de l'ADN (contrairement au spermatozoïde où près de 90% des CpG sont méthylés et où la répartition est plutôt uniforme sur le génome) (Stewart et al., 2016). Ceci peut expliquer que des défauts de méthylation ovocytaire ne semblent pas perturber leur développement ni la fécondation mais aboutissent à des arrêts de développement embryonnaire prématurés (Bourc'his et al., 2001; Branco et al., 2016). La reprogrammation épigénétique est donc indispensable pour assurer la fertilité des individus.

La différenciation des cellules souches spermatogoniales

La majorité de la méthylation a été apposée sur l'ADN des cellules germinales avant la naissance et celle-ci est considérée comme stable au cours de la spermatogenèse. Toutefois, quelques modifications de la méthylation sont observées, autant par déméthylation que méthylation *de novo*, et de manière séquence spécifique (Oakes et al., 2007). Kubo *et al.* ont notamment décrit une perte de la méthylation, dans les spermatogonies différenciées du testicule post-natal, au niveau de régions situées aux alentours de gènes importants pour leur fonction et la suite de la spermatogenèse. Cette déméthylation spécifique juste après la naissance concerne particulièrement des gènes impliqués dans la voie de la différenciation ou de l'auto-renouvellement tels que *Stra8*, pour lequel une déméthylation spécifique en amont du gène est observée dans les spermatogonies différenciées, ou *Plzf* dont la dynamique de méthylation est corrélée à son expression en vie post-natale dans les spermatogonies indifférenciées (Kubo et al., 2015). A l'inverse, Shirakawa *et al.* ont rapporté une augmentation du signal de 5mC lors de la transition spermatogonies indifférenciées vers spermatogonies différenciées, simultanément avec l'acquisition de cKIT et de l'expression des DNMT, et proposent ce changement comme nécessaire, voire comme étant un point de contrôle de la différenciation spermatogoniale (Shirakawa et al., 2013). Enfin, Dura *et al.* ont récemment mis en évidence le rôle primordial de la méthylation de l'ADN médiée par DNMT3A dans la différenciation des CSS (Dura et al., 2022). En effet, chez les souris invalidées pour *Dnmt3A*, une hypométhylation est globalement observée au niveau des îlots CpG, associée à une dérégulation transcriptionnelle : ceci ne perturbe ni la première vague de spermatogenèse ni leur capacité d'auto-renouvellement mais ampute les spermatogonies indifférenciées de leur plasticité à s'engager en différenciation.

Ainsi, la méthylation de l'ADN est essentielle à la plasticité et à la différenciation des cellules souches spermatogoniales, mais des remaniements des marques des histones ou de l'accessibilité chromatinienne semblent également impliqués, dépendamment ou non de la méthylation de l'ADN (Cheng et al., 2020; Dura et al., 2022; Liu et al., 2019).

La méiose

Juste avant la méiose, il y a une phase de réplication, la phase S pré-méiotique, au cours de laquelle la méthylation de l'ADN va devoir être apposée sur le brin nouvellement synthétisé. Une altération de la maintenance de la méthylation globale à ce moment-là entraîne de nombreux défauts méiotiques, notamment dans l'appariement des chromosomes homologues, et une mortalité germinale avant le stade pachytène (Dong et al., 2019; Y. Imai et al., 2020; Takada et al., 2021). L'hypométhylation au cours de la spermatogenèse est généralement associée à l'infertilité.

Une des causes potentielles est la réactivation des éléments transposables (ET), qui ne sont plus réprimés en absence de méthylation. Effectivement, il existe une double protection pour se prémunir de la réactivation délétère des éléments transposables : la méthylation de l'ADN et la diméthylation de l'histone 3 en lysine 4 (H3K4me2). Cependant, lors de son passage, PRDM9 transforme cette marque en H3K4me3, qui ne semble plus pouvoir réprimer les ET. Ainsi, en absence de H3K4me2, ce mécanisme inhibiteur repose sur la méthylation de l'ADN. De ce fait, une perturbation de la méthylation de l'ADN, comme c'est le cas dans les cellules germinales déficientes pour *Dnmt3L*, entraîne une réactivation des éléments transposables et une mortalité cellulaire (Bourc'his and Bestor, 2004; Webster et al., 2005; Zamudio et al., 2015). De plus, les ET actifs (enrichis en H3K4me3) pourront attirer la machinerie de recombinaison et ainsi entraîner des perturbations dans la formation des CDB (CBD abusives près des ET et absentes de certains points chauds). L'utilisation réduite des points chauds canoniques conduit à des défauts de la réparation des CDB et du synapsis (Zamudio et al., 2015).

En outre, la protéine multi-domaine UHRF1 (*ubiquitin-like with PHD and RING finger domains*) est capable de reconnaître la méthylation de l'ADN et les modifications des marques des histones et joue ainsi un rôle essentiel dans la régulation épigénétique, notamment au moment de la méiose. La déficience de UHRF1 chez les souris entraîne des défauts de méthylation, traduits par une augmentation du niveau global de 5hmC et des niveaux élevés de TET1, ce qui perturbe le profil d'expression des gènes méiotiques et aboutit à un échec de la méiose et à l'infertilité masculine (Pan et al., 2020).

Enfin, des études menées chez l'Homme rapportent un lien entre défauts de méthylation des spermatozoïdes et altérations de la qualité spermatique, notamment de la concentration, de la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes et ont fait un lien avec l'infertilité (Houshdaran et al., 2007; Laqqan et al., 2017).

Chapitre II : La pollution environnementale et son impact sur la fertilité

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis de l'augmentation de nouvelles substances chimiques dans l'environnement et leur impact sur la santé reproductive n'ont cessé d'augmenter. En parallèle, que ce soit dans la faune sauvage ou dans l'espèce humaine, une augmentation des anomalies de la fonction de reproduction a été mise en évidence. De nombreuses études expérimentales vont également dans ce sens et l'ensemble de ces données mettent en relation ces phénomènes (Oliveira et al., 2023; Pizzorno, 2018). Nous aborderons dans ce chapitre l'impact des polluants environnementaux (PE) sur notre santé, et en particulier sur notre fertilité, en précisant quelques-uns de leurs mécanismes de toxicité.

A) Les polluants environnementaux et leur impact sur la fertilité

Outre les effets sur la reproduction, de nombreuses fonctions de l'organisme semblent également altérées par l'exposition aux PE. Ainsi, l'impact des PE sur notre santé ne fait, de nos jours, plus aucun doute. D'après l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), 12,6 millions de décès sont imputables chaque année aux facteurs environnementaux (communiqué de presse du 15 mars 2016) et de multiples pathologies leur ont été associées chez l'Homme telles que des altérations du système reproductif, neurologique, respiratoire, des cancers, des maladies cardiovasculaires... (Heindel et al., 2017; Peters et al., 2021) (Figure 22).

En 1963, dans son livre intitulé *Silent Spring*, Rachel Carson est une des premières à dénoncer les effets négatifs de polluants environnementaux et notamment des pesticides sur la vie reproductive de la faune sauvage et en particulier celle des oiseaux. Cet ouvrage, vendu à plus de deux millions d'exemplaires à travers le monde, a permis une prise de conscience collective. Depuis lors, de nombreuses études ont porté sur les effets reprotoxiques des PE, chez l'Homme comme dans des modèles animaux. Les effets adverses des PE sur la fertilité s'expliquent par l'altération des fonctions stéroïdogènes et gamétogènes des gonades, affectant ainsi la capacité de reproduction.

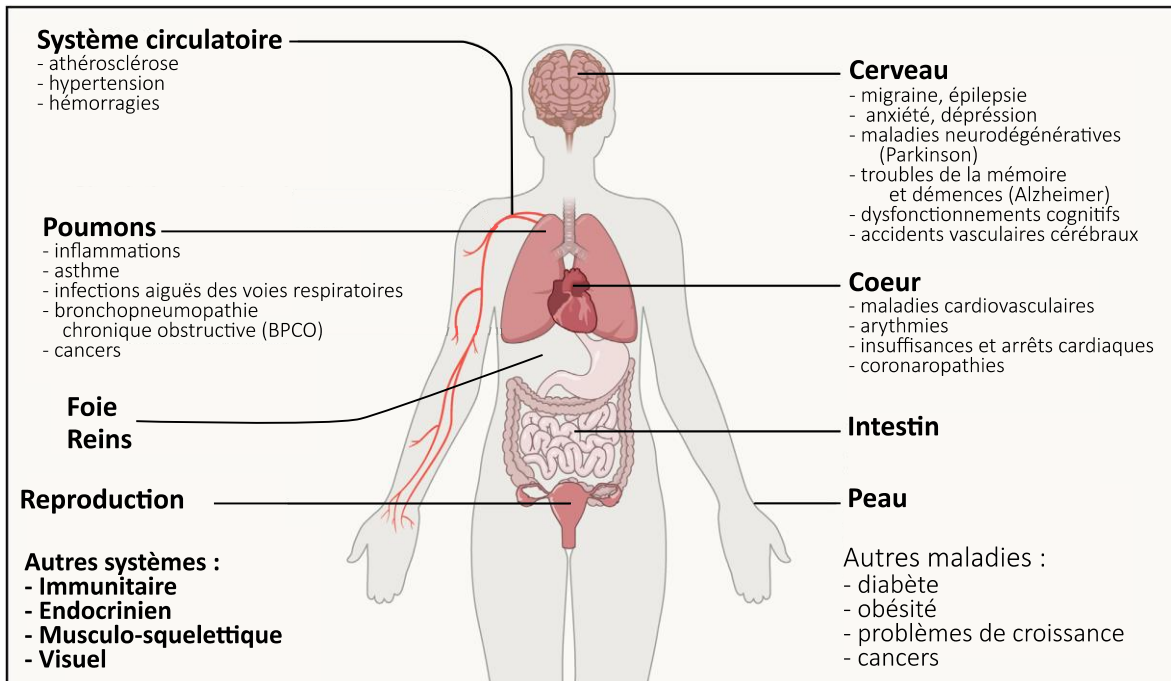


Figure 22. Effets des polluants environnementaux sur la santé humaine.

Les polluants environnementaux peuvent avoir un impact sur différents systèmes du corps humain (écritures en gras), ce qui conduit à de nombreuses pathologies (écritures fines). Adapté de Peters et al. (2021) et de Chang et al. (2021).

NB : l'appareil reproducteur représenté ici est féminin mais les effets des polluants environnementaux sur la santé décrits ici concernent aussi bien les femmes que les hommes.

1) Les perturbateurs endocriniens

La dérégulation endocrine induite par de nombreux polluants environnementaux explique en partie l'impact reprotoxique de ces PE. Le système endocrinien (Figure 23) constitue un des grands systèmes de communication de l'organisme et contrôle une multitude de fonctions par la libération, finement régulée, d'hormones au niveau des glandes endocrines. Parmi toutes les hormones, nous pouvant citer celles inhérentes à la reproduction que sont les gonadotrophines (FSH et LH) et les hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes).

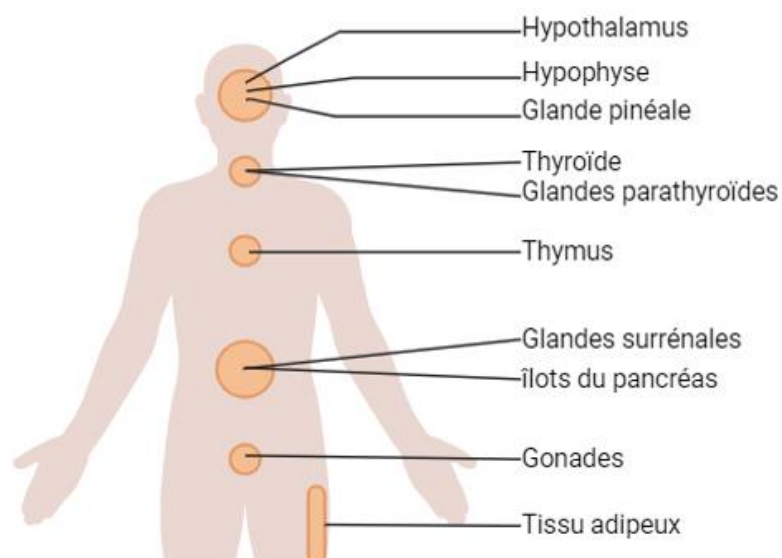


Figure 23. Le système endocrinien.

Le système endocrinien coordonne le fonctionnement des différents processus biologiques par le biais d'hormones, composés chimiques directement libérés dans la circulation sanguine par les glandes endocrines, glandes présentées dans ce schéma). Fait avec Biorender.

Une définition communément admise de la notion de « perturbateur endocrinien » a été proposée l’OMS en 2002 puis confirmée en 2012 : « un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène qui altère une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoque par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance ou de ses (sous) populations » (Bergman et al., 2012). Des substances caractérisées comme perturbatrices du système endocrinien sont retrouvées dans de nombreux produits du quotidien, notamment certains cosmétiques, emballages alimentaires, boissons, jouets...

Pour agir, les perturbateurs endocriniens sont capables d’interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison aux récepteurs ou l’élimination d’hormones endogènes (Kavlock et al., 1996). C’est notamment le cas des composés qui présentent structure semblable à celle d’une hormone endogène (on parle de xéno-hormone). La « liaison aux récepteurs » est une étape clef dans la réponse physiologique. Une fois libérées dans la circulation sanguine, les hormones vont rejoindre leur organe-cible et se lier à un récepteur afin d’induire une réponse adaptée. Parmi eux, les récepteurs nucléaires vont, après activation, aller se fixer directement au niveau de séquences spécifiques de l’ADN afin de moduler l’expression transcriptionnelle de gènes. De cette manière, que le polluant induise une activité agoniste ou antagoniste à celle de l’hormone endogène, l’activation inappropriée d’un récepteur par la liaison d’un PE peut induire des perturbations cellulaires et métaboliques et aboutir à des effets néfastes pour le développement et la santé des individus (Falck et al., 1992; Germain et al., 2006). En ce qui concerne la fonction de reproduction, les récepteurs nucléaires les plus importants pour les mammifères sont les récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes et à la progestérone.

Parmi les perturbateurs endocriniens les plus étudiés et pour lesquels nous sommes quotidiennement exposés, nous trouvons les plastifiants, et notamment les bisphénols et les phtalates.

Le bisphénol le plus connu et le plus étudié est sans doute le bisphénol A (BPA – 4,4'-isopropylidenediphenol ou 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-propane). Développé à la fin du XIXème siècle, il a d’abord été utilisé dans l’industrie pharmaceutique avant d’être majoritairement employé dans l’industrie du plastique. Grâce à ses propriétés mécaniques et élastiques, sa légèreté et son faible coût, le BPA a été impliqué dans la fabrication d’une multitude de produits de la vie quotidienne : résines époxy utilisées comme revêtement couvrant l’intérieur des boîtes de conserves ou des canettes, bouteilles et autres contenants alimentaires, jouets, tétines, consommables et dispositifs médicaux (lunettes, fil dentaires, etc), tickets de caisse et autres papiers thermiques... De par ses fortes ressemblances structurales avec l’œstradiol (Figure 24), le BPA, une fois dans l’organisme, est capable de se lier aux récepteurs aux œstrogènes sous sa forme active (forme libre ou non conjugué) et

d'induire ainsi de multiples effets, notamment au niveau de la fonction de reproduction (Delfosse et al., 2014; Rouiller-Fabre et al., 2015). Le BPA a d'ailleurs été déclaré comme composé reprotoxique dès 2002 par la Commission européenne. Le BPA est pris en charge et éliminé au niveau du foie et de l'intestin mais certains métabolites produits peuvent également engendrer différents effets nocifs dans nos organismes (Dodds and Lawson, 1936; Lacroix et al., 2011). Le BPA est largement retrouvé dans les fluides biologiques : sérum, urines mais a aussi été retrouvé dans le plasma fœtal ou le lait maternel (Fernandez et al., 2007; Vandenberg et al., 2012).

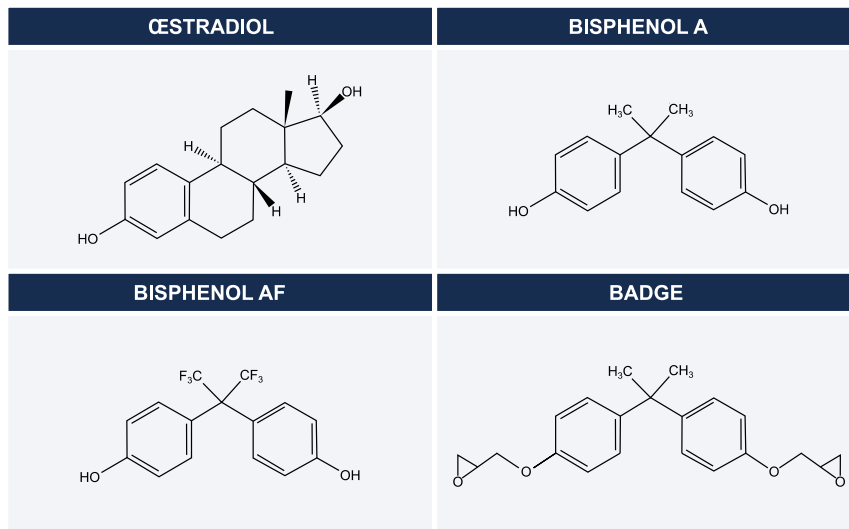


Figure 24. Structure chimique de l'œstradiol, du bisphénol A et de deux de ses analogues.
Adapté de Grimaldi et al. (2019)

Ainsi, les effets délétères du BPA, dans de nombreux organismes, mammifères ou non, ne sont plus à démontrer. Il a tout d'abord été interdit par la Commission Européenne dans la fabrication des biberons et emballages alimentaires à destination des nourrissons en 2011. Puis, en 2017, l'Agence européenne des produits chimiques le reconnaît comme substance « extrêmement préoccupante », ce qui conduit, en un plus tard, à la promulgation d'une législation limitant son utilisation dans tous les matériaux en contact avec les aliments. Très récemment, les experts de l'autorité européenne de sécurité des aliments ont réévalué la dose journalière tolérable, l'abaissant à 0,2 nanogrammes par kilogramme de poids corporel et par jour (20 000 plus basse que la précédente).

Suite à ces législations, les industriels ont développé des alternatives au BPA, *i.e.* des substances chimiques présentant des similitudes structurelles ou fonctionnelles avec le BPA : on les appelle analogues ou dérivés du BPA. Ces composés sont extrêmement nombreux, et contrairement au BPA, la toxicité potentielle pour l'Homme de la plupart d'entre eux est encore mal connue. Toutefois ils ont été massivement utilisés dans des indications similaires à celles du BPA et on observe de nos jours une exposition généralisée à ces analogues : dans les denrées alimentaires, la poussière

domestique, les sédiments fluviaux et lacustres, les produits de soins personnels et le papier thermique, jusqu'à être aussi détectés dans des échantillons biologiques humains (Liao et al., 2012; Pelch et al., 2017; Vasiljevic and Harner, 2021). Parmi ces analogues, nous pouvons citer le Bisphénol A diglycidyl ether (BADGE) utilisé de manière courante dans l'industrie agro-alimentaire et le Bisphénol AF (BPAF) retrouvé principalement dans les élastomères et les composants électroniques (Figure 24). Le BPAF présente une des affinités les plus fortes pour les récepteurs aux œstrogènes (Delfosse et al., 2012; Grimaldi et al., 2019) alors que l'action du BADGE semble plutôt médiée par son activité antagoniste du récepteur PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*, isotype γ) (Grimaldi et al., 2019).

Le DEHP (di(2-ethylhexyl)phtalate) est le phtalate le plus produit dans le monde. Ce plastifiant est utilisé dans de nombreux matériaux de construction et d'ameublement, des dispositifs médicaux et des cosmétiques. Interdit dans les articles de puériculture et les cosmétiques, l'utilisation du DEHP est seulement réglementée dans les produits de constructions, de décorations ou les vêtements, malgré sa reconnaissance, avec l'ensemble des phtalates, comme substance cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR) par le parlement européen en 2008. Après absorption, le DEHP est rapidement métabolisé, notamment en MEHP (mono-2-ethylhexyl phtalate), son métabolite actif dans le testicule (Figure 25). Le DEHP et ses métabolites ont été associés à des effets délétères sur les systèmes endocriniens, reproducteur, neuraux, hépatique et cardiovasculaire, sur des modèles animaux et sur l'Homme, *in vitro* et *in vivo* (Chang et al., 2021; Rowdhwil and Chen, 2018). Dans le testicule, le MEHP présente des effets anti-œstrogéniques et anti-androgéniques (Kim et al., 2019).

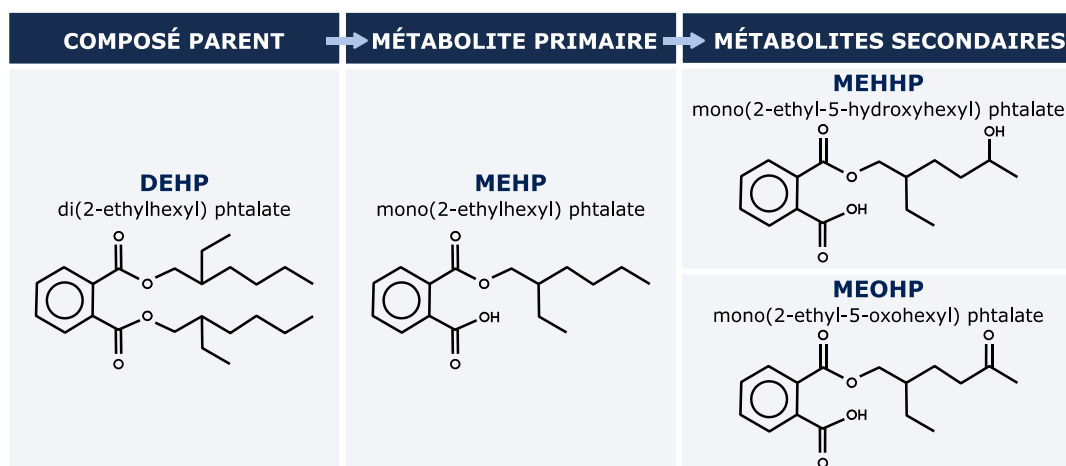


Figure 25. Structure chimique du DEHP et de ses métabolites principaux.

Le métabolisme du DEHP aboutit à la formation d'une vingtaine de métabolites. Sous sa forme libre, le DEHP a une demi-vie sanguine courte de l'ordre de 28 minutes. Il est tout d'abord hydrolysé en MEHP, métabolite majoritaire dans le sang, qui sera à son tour hydrolysé. Quatre métabolites secondaires sont retrouvés dans le sang chez l'Homme, dont le MEHHP et le MEOHP. D'après Albert et Jégou (2014).

A l'instar de nombreux perturbateurs endocriniens, les sources d'exposition aux phtalates et bisphénols sont mixtes : 1/ la voie orale principalement, autant par l'eau que par l'alimentation, 2/ l'air, notamment par l'inhalation de poussières domestiques produites par la dégradation continues de matières plastiques, 3/ la barrière cutanée et 4/ la voie parentérale qui constitue une voie non négligeable de contamination.

Du fait de leur action de perturbation endocrine, ces composés vont notamment altérer la stéroïdogénèse mâle et femelle via des actions directes ou indirectes sur les cellules stéroïdogènes gonadiques. Ainsi, la production de stéroïdes va être affectée et va, de fait, impacter grandement les fonctions de reproduction (Arzuaga et al., 2019; Rattan et al., 2017).

Toutefois, les cellules somatiques gonadiques ne sont pas les seules à être sensibilisées par une exposition au phtalates et au BPA (et, par extension, aux perturbateurs endocriniens). Les cellules germinales, elles aussi, peuvent être impactées, et cela, indépendamment de la modulation endocrine imposée par ces composés. Des moments de sensibilité spécifiques aux cellules germinales, telle que la méiose, ont été mis en évidence, aussi bien chez le mâle que chez la femelle. Le BPA a d'ailleurs été le premier composé mis en évidence, grâce aux travaux de Patricia Hunt au début des années 2000, comme étant capable d'interférer avec la méiose (Hunt et al., 2003). De ce fait, ce composé va avoir des effets délétères non négligeables chez la femme, où le stock de gamètes est limité.

Altération gamétique, méiose et exposition au BPA

Etudes épidémiologiques chez la femme

Les premières études épidémiologiques sur le BPA ont commencé à émerger dans les années 2000. L'équipe de Takeuchi *et al.* a mis en avant une corrélation positive entre taux sériques de BPA et syndrome des ovaires polykystiques (Takeuchi et al., 2004) et a ainsi été la première à montrer que le BPA est impliqué dans l'augmentation des pathologies ovariennes chez la femme. A la suite de cela, de multiples études ont décrit les effets reprotoxiques du BPA et ont cherché à comprendre l'origine de ces défauts.

En outre, Caserta *et al.* observaient dès 2013 des taux importants de BPA dans les fluides biologiques des femmes rencontrant des problèmes à concevoir (Caserta et al., 2013). Récemment, les équipes de Nazlı Yenigül et Aftabsavad ont fait les mêmes observations, *i.e.* que les taux de BPA dans le sérum maternel et le liquide folliculaire sont négativement corrélés à la qualité des ovocytes et le taux de grossesse clinique (Aftabsavad et al., 2021; Yenigül et al., 2021). De même, des taux élevés de BPA ont pu être associés à une diminution du nombre de follicules antraux dans les ovaires, une maturation ovocytaire défectueuse et à une baisse des taux d'AMH, hormone indicatrice de la réserve ovarienne (Matuszczak et al., 2019; Peretz et al., 2014; W. Zhou et al., 2016).

Toutefois, les résultats obtenus peuvent parfois être contradictoires et ne pas être corrélé forcément à un défaut ovocytaire. Louis *et al.* n'observaient pas de corrélation entre taux urinaires de BPA et défauts de fécondité des ovocytes humains *in vitro* en 2014 là où Wang *et al.* ont décrit, quatre ans plus tard, une association forte entre ces deux paramètres (Buck Louis et al., 2014; Wang et al., 2018). Ceci permet de mettre en avant les limites des études épidémiologiques dans la caractérisation des effets d'une substance donnée sur la reproduction humaine. Celles-ci ne prennent généralement pas en compte des facteurs tels que la co-exposition, ce qui rend les résultats de ces études très variables et n'apportent que peu d'éléments sur les effets propres de la substance étudiée.

Etudes expérimentales_ exposition adulte

Chez le mâle, Jin *et al.* ont rapporté qu'une exposition de rats adultes au BPA, pendant 14 jours et à faible dose, entraînait une diminution de la quantité et de la qualité des spermatozoïdes (Jin et al., 2013). Ils observent également une diminution du nombre de cellules germinales du testicule par apoptose (valable pour chaque type cellulaire : spermatogonies, spermatocytes, spermatides). Enfin, ils constatent un abaissement des taux sériques de testostérone et de FSH. Les équipes de Ali et Liu décrivent, chacune de leur côté, des problèmes méiotiques suite à l'exposition de rats mâles adultes au BPA, ce qui conduit à un arrêt au stade pachytène (Ali et al., 2014; Liu et al., 2013). Les mêmes défauts sont constatés dans d'autres espèces, notamment la souris et l'Homme (Liu et al., 2021; Mínguez-Alarcón et al., 2016; Wang et al., 2022).

Chez la souris femelle, Hunt *et al.* concluent, avec des expériences qu'une exposition de courte durée, *in vitro*, et à une faible dose de BPA, pendant les derniers stades de la croissance des ovocytes est suffisante pour provoquer des défauts de la maturation des ovocytes et de ségrégation des chromosomes homologues qui conduisent à la formation d'ovocytes aneuploïdes (Hunt et al., 2003). Des altérations de la stéroïdogénèse et de la régulation du cycle œstral ont également été observées (Richter et al., 2007). Enfin, Li *et al.* ont récemment observé, également *in vitro*, que le BPA pouvait aussi perturber l'expansion des cellules du cumulus et la communication ovocyte/granulosa (Li et al., 2023).

Etudes expérimentales_ expositions fœtales et néonatales

De manière intéressante, de nombreuses études animales ont montré que des expositions prénatales et/ou néonatales à divers PE étaient particulièrement délétères pour la santé et la vie reproductive. Chez le mâle, l'exposition périnatale au BPA chez la souris et le rat conduit à des altérations préméiotiques et méiotiques et une apoptose massive germinale (Chianese et al., 2018; Xie et al., 2016). De leur côté, Pagotto *et al.* ont étudié l'impact de l'exposition au BPA du 5^{ème} jour de vie fœtale au 7^{ème} jour de vie néonatale chez la souris (Pagotto et al., 2020). Ils observent, chez les mâles

en fin d'exposition, une proportion plus élevée de spermatogonies indifférenciées, ce qui conduit à une diminution du nombre de spermatozoïdes épидидymaires à l'âge adulte. La différenciation foétale mâle des cellules germinales est aussi affectée. En effet, des études menées dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence, dans un modèle de culture organotypique et dans un modèle de xénotransferts, que l'exposition au BPA des testicules foétaux humains du premier trimestre induisait également une diminution du nombre de cellules germinales par augmentation de l'apoptose ainsi que des défauts de différenciation (diminution des cellules indifférenciées AP2 γ -positives au profit des cellules différenciées exprimant MAGEA4) (Eladak et al., 2018).

Chez la femelle, un des événements majeurs pour les cellules germinales qui se déroule pendant la vie foétale est l'établissement du programme méiotique. Une perturbation à ce moment-là, notamment par des PE, entraîne des défauts méiotiques et par ce biais conduit à des altérations de fertilité conséquentes, dont des interruptions spontanées de grossesses et des défauts de croissance et de développement de la descendance. Encore une fois, les effets du BPA sont particulièrement bien décrits, *in vitro* mais aussi *in vivo*, chez les nématodes, les rongeurs, les brebis... De manière générale, l'exposition d'ovaires foétaux au BPA induit des altérations de l'expression des gènes méiotiques, des problèmes de synapsis des chromosomes homologues, des défauts dans la réparation des CDB méiotiques, des associations inhabituelles entre des chromosomes hétérologues, une perturbation de la progression de la prophase I méiotique, et des erreurs de ségrégation des chromosomes homologues pendant la métaphase (Allard and Colaiácovo, 2010; Brieño-Enríquez et al., 2012; Loup et al., 2022; Susiarjo et al., 2007; H.-Q. Zhang et al., 2012).

De manière générale, les altérations ayant eu lieu pendant la vie périnatale par une exposition précoce au BPA conduisent à des altérations à l'âge adulte, chez le mâle comme chez la femelle. Une diminution de la qualité et de la quantité des gamètes induisant des défauts de fertilité sont décrits, parfois sur plusieurs générations (Hunt et al., 2012; Pagotto et al., 2020; Salian et al., 2009; Vrooman et al., 2015; H.-Q. Zhang et al., 2012).

Comme nous l'avons mentionné dans le cas du BPA, la méiose est un événement d'extrême sensibilité face aux polluants et toute perturbation conduit à la diminution de la qualité et de la quantité des gamètes mâles et femelles. Toutefois, la différenciation des cellules germinales (en vie foétale ou néonatale) est un événement à ne pas négliger et en particulier le passage d'un état pluripotent et prolifératif à un état différencié. Chez le mâle, une altération de la transition mitose/quiescence pendant la vie périnatale peut conduire, en dehors des problèmes de fertilité, au développement de cancer germinal testiculaire par le maintien de cellules à un état prolifératif indifférencié.

2) Polluants environnementaux et cancers testiculaires

Le cancer testiculaire est le cancer le plus courant chez les hommes jeunes et est très majoritairement d'origine germinale : on parle de tumeur des cellules germinales testiculaires (TCGT). En 45 ans, l'incidence des TCGT a très nettement augmenté dans la plupart des pays industrialisés. En France, les TCGT affichent un taux d'augmentation constant de 2,5 % par an (Kudjawu et al., 2012; Skakkebaek et al., 2016; Trabert et al., 2015). Bien qu'il s'agisse d'un des cancers les mieux soignés par radiothérapie et/ou chimiothérapie, ces traitements induisent une hypofertilité voire une infertilité. De plus, plusieurs études montrent que les hommes atteints de TCGT ont souvent une qualité spermatique diminuée et une moins bonne fertilité plusieurs années avant que la tumeur ne soit diagnostiquée (Berthelsen and Skakkebaek, 1983; Møller and Skakkebaek, 1999; Walsh et al., 2009). La cause de ces cancers n'est pas encore bien comprise mais de nombreux éléments suggèrent que la lésion initiale, le carcinome *in situ* (CIS), viendrait d'un défaut de différenciation des cellules germinales primordiales fœtales. Sonne *et al.* ont par exemple comparé, grâce à un séquençage par puces, le profil transcriptionnel du CIS avec celui de gonocytes, d'ovogonies, et de cellules souches embryonnaires (Sonne et al., 2009). Ils observent une très grande similarité entre CIS et gonocytes avec seulement 5 gènes divergents parmi les gènes les plus différentiellement exprimés. Almstrup *et al.* décrivent, de leur côté, une similarité de plus de 50% entre les profils transcriptionnels de cellules issu de CIS et de cellules souches embryonnaires (Almstrup et al., 2004). Parmi les gènes communément exprimés, nous retrouvons des gènes tels que *OCT4*, *NANOG*, *TFAP2C* et *MAGEA4* (Almstrup et al., 2004; Rajpert-De Meyts, 2006; Sonne et al., 2009). Des observations similaires sont faites en ce qui concerne l'état épigénétique des cellules, avec une hypométhylation globale de l'ADN caractéristique des cellules pluripotentes, et l'expression atypique de deux allèles de gènes normalement soumis à l'empreinte parentale (Fukushima et al., 2017; Oosterhuis and Looijenga, 2019; van Gurp et al., 1994). Le CIS présente donc des caractéristiques transcriptionnelles et épigénétiques communes aux cellules germinales fœtales.

Hardell a été le premier, en 2003, à réaliser une étude cas-témoin et à corrélérer la présence de polluants organiques persistants (POP), tels que les chlordanes et les biphényles polychlorés, dans le sang maternel et la survenue de cancers testiculaires (Hardell et al., 2003). Une récente étude française a aussi montré un lien entre l'utilisation domestique de pesticides, en particulier de fongicides, au cours des premières périodes de développement et le risque de TCGT chez l'adulte (Danjou et al., 2021). Ainsi, même si les mécanismes qui relient l'exposition prénatale aux PE et le défaut de différenciation germinale à l'origine du CIS ne sont pas clairement identifiés, la survenue du CIS semble pouvoir être associée à une exposition prénatale à certains PE (Faja et al., 2022; Hardell et al., 2006). Il est intéressant de noter que les souris ne développent pas spontanément de cancer testiculaire, ce

qui ne facilite pas l'étude de cette pathologie. En revanche, il existe différents modèles dans lesquels une perturbation de la différenciation des cellules germinales primordiales, par la suppression de DND1 (*Dead end1*), NANOS3 ou DAZL, peut être associée à l'apparition de cancers testiculaires (A. Imai et al., 2020; Nicholls et al., 2019; Schemmer et al., 2013).

B) Mécanismes de toxicité

Les polluants environnementaux de tous types induisent, dans nos organismes, des réponses biologiques à tous les niveaux : comportemental, hormonal, métabolique, protéomique, génétique, épigénétique et transcriptionnel...(Wu et al., 2023). Peters *et al.* proposent huit effets principaux des polluants environnementaux, récurrents et démontrés de manière scientifique chez l'Homme (Figure 26).

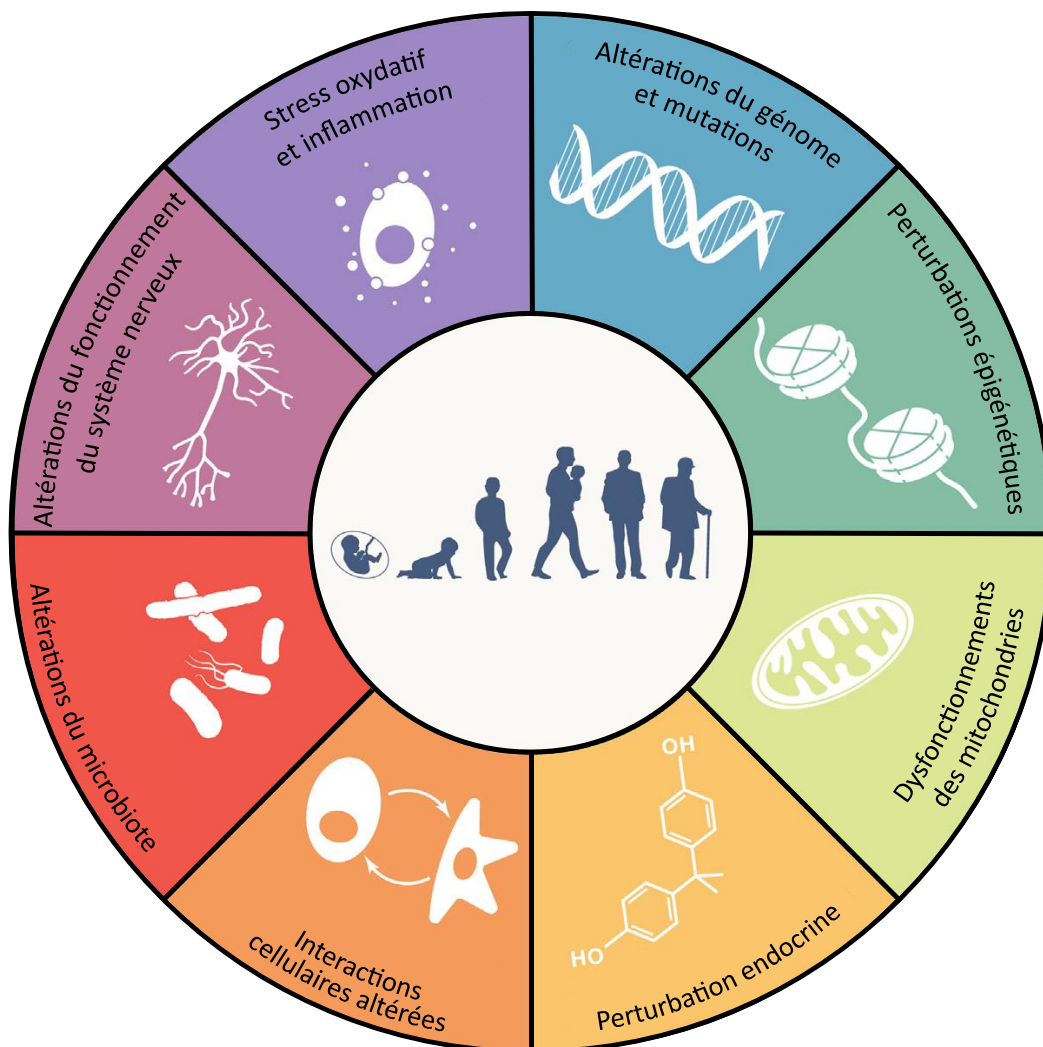


Figure 26. Catégorisation des effets des polluants environnementaux.

Le schéma énumère les huit effets les plus attribués aux polluants environnementaux. D'après Peters et al. (2021).

Un des impacts incontestables est la capacité de perturbation endocrine que partagent une grande partie des polluants environnementaux. Comme détaillé auparavant, la fonction endocrine est primordiale dans nos organismes et de nombreux composés peuvent entraver la synthèse, le transport et l'activité des hormones endogènes ou détourner leurs voies d'action du fait de leur structure hormo-mimétique. Toutefois, cela ne peut pas expliquer la totalité des conséquences observées et la sensibilité des cellules germinales, notamment lors de la méiose, ne s'explique pas totalement par cette activité de modulation endocrine.

1) Les altérations épigénétiques

La grande majorité des polluants environnementaux sont capables d'induire des modifications de l'épigénome. Comme évoqué dans le premier chapitre, les remaniements épigénétiques sont très finement régulés au cours de la différenciation germinale, ce qui est crucial pour assurer une bonne fertilité. Ainsi, de nombreux polluants environnementaux ont été incriminés dans une perturbation des fonctions reproductrices par des modifications épigénétiques. Une des premières équipes de recherche à décrire ce phénomène a été celle de Skinner dès 2005. Ils ont exposé des rates gestantes (de 8 à 15 jpc) à de la vinclozoline ou au méthoxychlore, respectivement un fongicide et un insecticide (Anway et al., 2005). Ils décrivent alors, grâce à des techniques de PCR (*polymerase chain reaction*) couplées à l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation, une altération des schémas de méthylation de l'ADN dans la lignée germinale qu'ils corrèlent à des défauts de spermatogenèse (diminution du nombre et de la vitalité des spermatozoïdes, augmentation de l'apoptose et des problèmes de fertilité). Ces effets ont été transmis à travers la lignée germinale à presque tous les mâles des trois générations suivantes examinées.

En ce qui concerne le BPA, différentes études ont permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression génique par le biais d'altérations de la méthylation après exposition périnatale ou adulte au BPA (Junge et al., 2018; Kundakovic et al., 2013; Weinhouse et al., 2015; Wong et al., 2015). Au niveau des cellules germinales, Zhang *et al.* ont mis évidence que ce composé pouvait également induire une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau des gènes soumis à l'empreinte dans les cellules germinales fœtales murines ainsi qu'une diminution de la quantité d'ARNm dans les gonades femelles, STRA8 et DAZL étant notamment touchés (X.-F. Zhang et al., 2012).

L'équipe de Li a étudié *in vitro* l'effet d'une exposition au BPA sur une lignée cellulaire spermatogoniale (GC-1) (Li et al., 2018). Ils observent une diminution des niveaux globaux de la méthylation de l'ADN ainsi qu'une réduction des niveaux d'expression au niveau protéique et de l'ARNm d'ADN méthyltransférases. Ils décrivent aussi une diminution globale de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Pour leur part, Zhang *et al.* décrivent que l'exposition *in vitro*

de testicules de souris prépubères au BPA et au DEHP altère la spermatogenèse *via* à une perturbation de H3K9me2. En, dehors du BPA et du DEHP, d'autres PE présentent la capacité d'induire des modifications des marques des histones (Gao et al., 2019; Gely-Pernot et al., 2018; Legoff et al., 2019).

Enfin, le plus grand nombre de preuves quant à l'effet des PE sur le paysage épigénétique des cellules germinales a été accumulé au niveau des spermatozoïdes. Chez la souris comme chez l'Homme, un lien a été fait entre exposition aux PE, faible qualité spermatique et défaut de méthylation de l'ADN dans les spermatozoïdes, notamment avec les bisphénols et les phtalates (Laing et al., 2016; Manikkam et al., 2013; Miao et al., 2014; Sidorkiewicz et al., 2018; Sugiyama et al., 2022; Xia et al., 2018; Yang et al., 2021). Han et Huang ont d'ailleurs récemment recensé un grand nombre de PE ayant des impacts sur la fertilité mâle via des modifications épigénétiques (Han and Huang, 2021). Ces modifications épigénétiques induites dans les cellules germinales par exposition à un PE peuvent être transmises aux générations futures et être à l'origine d'infertilités et de maladies (Skinner, 2014).

Même si les études présentées ici se focalisent généralement sur une ou deux marques épigénétiques, ce qu'il se passe au sein des cellules est bien plus complexe. Il s'agit en réalité d'un spectre d'informations épigénétiques (dont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'expression d'ARN non codant) qui agissent de concert.

Une question reste aujourd'hui en suspens. Par quels mécanismes les polluants environnementaux perturbent-ils l'épigénome cellulaire ? Une partie de la réponse peut être trouvée dans la susceptibilité de certaines enzymes, à répondre à l'exposition à de nombreux polluants environnementaux. En effet, diverses études décrivent des modulations au niveau transcriptionnel et/ou traductionnel de l'expression de TET1, DNMT1, DNMT3A et DNMT3B notamment après exposition au PE (Doshi et al., 2011; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2020). Un autre élément de réponse pourrait être le stress oxydatif puisque de nombreux polluants environnementaux ont été décrits comme pro-oxydants et qu'il existe un lien entre espèces réactives de l'oxygène et modifications épigénétiques (Abdollahi et al., 2004; Donaldson et al., 2003; Kietzmann et al., 2017; Monks et al., 2006).

2) Les PE sources d'oxydation

Le stress oxydatif est un déséquilibre, au sein d'une cellule, entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités antioxydantes. Bien que les ERO soient strictement nécessaires à de nombreux processus biologiques, leur présence en excès est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques invalidantes chez l'Homme, et a aussi été associé à l'infertilité, masculine comme féminine (Agarwal et al., 2005; Bisht et al., 2017). Takeshima

et al. rapportent qu'en fonction des études, 30 à 80% des hommes souffrant d'infertilité présentent une production excessive d'ERO dans leur éjaculat (Takeshima et al., 2021).

Plusieurs études chez l'Homme et l'animal soutiennent l'idée que de nombreux polluants environnementaux sont capables de produire un effet reprotoxique par l'induction d'un stress oxydatif. Les premières études dans ce sens ont été basées basent sur l'exposition de rats à des métaux lourds (Arafa et al., 2009; Hsu et al., 1997). Les phtalates et des bisphénols sont également décrits comme substances pro-oxydantes, y compris dans des études épidémiologiques (Kataria et al., 2017). L'exposition au BPA peut induire une réduction de la capacité anti-oxydante par la diminution de la présence des enzymes anti-oxydantes chez les souris (Kabuto et al., 2003). En ce qui concerne les cellules germinales, l'équipe de Kaur a décrit une augmentation des ERO associée à de multiples anomalies structurelles des tubes séminifères et une diminution du nombre de cellules germinales par augmentation de l'apoptose après exposition de souris adultes au BPA pendant 4 semaines (Kaur et al., 2018). De leur côté, Mondal *et al.* observent des résultats similaires après exposition pendant 3 mois à un phtalate, à savoir des altérations de l'architecture testiculaire accompagnées d'une perturbation de l'équilibre oxydant/antioxydant dans les cellules germinales. Ils mettent aussi en avant une activation de la réponse inflammatoire (Mondal et al., 2019). Ces deux études concluent que l'oxydation, induite par une exposition aux bisphénols ou phtalates, aboutit à des altérations du nombre, de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes. En complément, l'ajout d'antioxydants au BPA sur des spermatozoïdes *in vitro* ou administré à des souris et des poissons *in vivo*, permet de contrer les effets néfastes du BPA et de restaurer la fertilité et la capacité à féconder des spermatozoïdes (Kaur et al., 2018; Rahman et al., 2019; Yuan et al., 2019).

Pour conclure, nous sommes continuellement exposés à une multitude de polluants environnementaux, substances qui peuvent avoir de multiples effets sur notre santé et notre fertilité, et même notre descendance. Le moyen le plus efficace de minimiser les effets néfastes des PE sur notre santé serait de réduire ou d'éviter notre exposition à toutes les sources, ce qui paraît extrêmement difficile dans notre société, malgré les efforts collectifs déjà mis en place. Il est donc crucial de décrypter précisément les mécanismes d'action de ces substances afin de mieux anticiper, neutraliser ou soigner leurs effets.

Chapitre III : Les lésions oxydatives de l'ADN

A) L'oxydation : un équilibre à trouver

1) Formation des espèces réactives de l'oxygène

Au sein de chaque cellule, l'utilisation de l'oxygène dans de nombreuses réactions métaboliques peut aboutir à la formation de radicaux libres. Ces sous-produits sont, par définition, des espèces chimiques possédant au moins un électron non apparié sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité (Pham-Huy et al., 2008). Les radicaux libres les plus fréquents sont l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, les radicaux peroxydes ROO^{\bullet} et le radical hydroxyle $\bullet OH$, la plus délétère des espèces radicalaires. Les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'oxygène singulet 1O_2 , ne possèdent pas d'électron libre mais peuvent également induire une toxicité cellulaire. Ensemble, radicaux libres et espèces non radicalaires forment les espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont les principaux mécanismes de production sont présentés en figure 27.

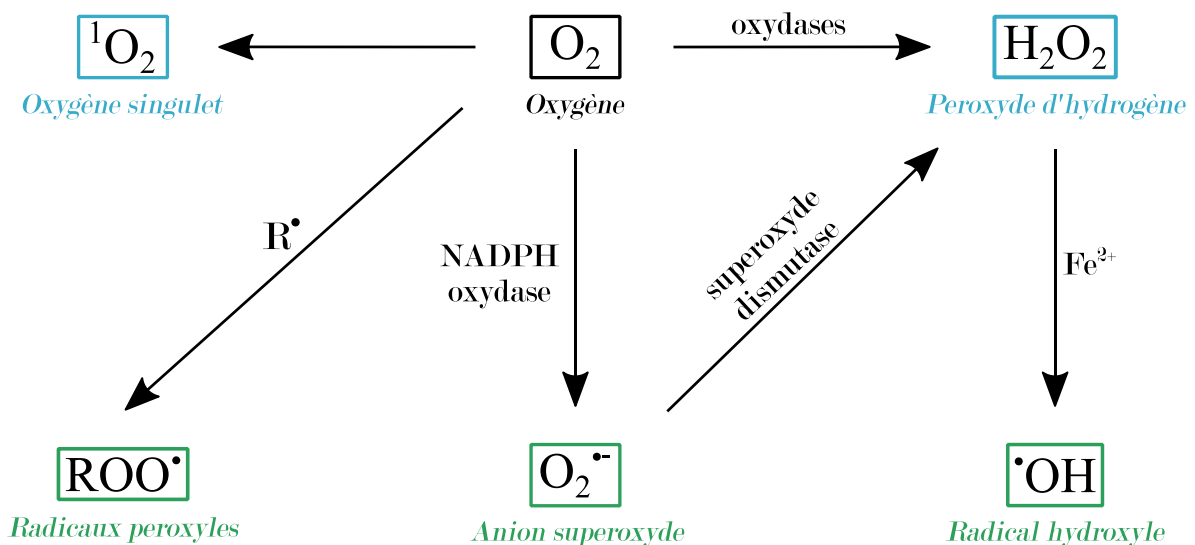


Figure 27. Origine des principales espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

L'oxygène peut former, par des réductions à un électron, différents radicaux libres (encadrés en vert). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces non radicalaires (encadrées en bleu) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et des espèces non radicalaires sont appelées espèces réactives de l'oxygène. Adapté de Favier (2003).

La source intracellulaire majoritaire d'ERO est la mitochondrie *via* l'activité de la chaîne respiratoire, au cours de la production d'énergie (ATP) par phosphorylation oxydative. Des ERO sont également produites en quantité moindre par le métabolisme cellulaire, dans le cytosol ou dans différents organites. C'est le cas par exemple au cours du trafic vésiculaire dans le réticulum endoplasmique ou par l'activité de complexes enzymatiques comme NOX, la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase, située dans la membrane plasmique (Migdal and Serres, 2011; Snezhkina et al., 2019). Hormis ces sources endogènes, de nombreux éléments sont capables d'induire la formation d'ERO, tels que les radiations ionisantes, le tabac et l'alcool, un excès de sport ou la sédentarité, des maladies métaboliques et l'inflammation, un manque de sommeil régulier et les polluants environnementaux (Carraro et al., 2018; Sharifi-Rad et al., 2020).

2) Les ERO, des éléments indispensables

Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans la signalisation et la régulation cellulaire et sont, de fait, nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. C'est dans des ovocytes d'oursins qu'a été observée pour la première fois, une explosion respiratoire juste après la fécondation (Warburg 1908 – disponible uniquement en allemand). Il aura fallu près de 100 ans pour que Wong *et al.* comprennent le mécanisme sous-jacent : cette consommation accrue d'O₂ provient de l'action d'une enzyme NOX afin de convertir l'O₂ en H₂O₂, indispensable pour l'inhibition de la polyspermie et la régulation des premiers clivages zygotiques (Wong et al., 2004; Wong and Wessel, 2005). Cela a constitué une des premières preuves de l'implication des ERO dans des processus physiologiques.

Les fonctions biologiques des ERO ont été ensuite détaillées : elles interviennent dans des voies de signalisation comme les voies NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), ou PI3K-AKT (PhosphoInositide 3-Kinase - protéine kinase B), dans lesquelles elles ont un rôle de transduction et d'amplification du signal par modulations de kinases, phosphatases ou facteurs de transcription (Dröge, 2002; Zhang et al., 2016). Les ERO ont alors un véritable rôle de second messager et l'on parle de signalisation redox. À l'échelle physiologique, les ERO permettent la régulation du tonus vasculaire, l'adhésion plaquettaire ou la défense microbienne (Dröge, 2002; Stasia, 2007). Les ERO ont également un rôle primordial dans le maintien, l'auto-renouvellement, la survie et surtout la différenciation de plusieurs populations de cellules souches, adultes comme fœtales (Nugud et al., 2018; Sinenko et al., 2021). En effet, en fonction du métabolisme énergétique utilisé par les cellules, la quantité d'ERO produites sera différente et cela peut jouer un rôle dans leur différenciation. C'est le cas de la cellule germinale, dans laquelle on observe que la différenciation est accompagnée de plusieurs transitions métaboliques, alternant entre glycolyse anaérobie et phosphorylation oxydative,

indispensables entre autres pour la spécification des CGP, la différenciation des prospermatogonies et l'initiation méiotique (Du et al., 2021; Hayashi et al., 2017; Sainz de la Maza et al., 2017; Zhao et al., 2018). En dehors de ces deux processus, les ERO sont importantes pour les cellules germinales : les niveaux d'ERO ont été associés à une migration correcte des CGP chez la drosophile, mais également à la formation des gonades ainsi qu'à leur maintien à l'état souche et leur différenciation (Syal et al., 2020; Tan et al., 2017). Plus généralement, les ERO semblent impliquées, chez le mâle, dans la maturation des spermatozoïdes et en particulier la capacitation ainsi que dans la réaction acrosomique (Barati et al., 2020). Chez les femelles, la sélection d'un ovocyte dominant semble dépendre d'une légère augmentation de la quantité d'ERO intracellulaires (Agarwal et al., 2012).

L'importance des ERO dans les processus biologiques n'est plus à démontrer. Cependant, comme évoqué dans le chapitre II, tout est une question d'équilibre au sein de chaque cellule. En fonction de la nature chimique de l'ERO, de son niveau et de son site de production, les réponses peuvent être multiples et hétérogènes et varier de manière très sensible. Ainsi, la production en excès d'ERO peut avoir un réel impact sur la fonctionnalité de la cellule et conduire à sa mort.

3) Défauts de la balance oxydative

Ainsi, afin de lutter contre un excès d'ERO, plusieurs mécanismes biologiques ont été mis en place. Le moyen de défense principal est un ensemble de composés regroupés sous le terme d'antioxydants, capables de s'adapter au taux de radicaux libres présents. On peut retrouver les antioxydants enzymatiques, capables de piéger et métaboliser de manière très efficace les ERO et qui sont spécifiques des différents types d'ERO telles que les superoxydes dismutases, la catalase, la glutathion peroxydase... Toutefois celles-ci ne sont présentes qu'à des concentrations relativement faibles dans la cellule. Les antioxydants non enzymatiques sont moins puissants mais très nombreux lorsqu'ils sont cumulés. On peut citer le glutathion (et son précurseur le N-acétylcystéine), les vitamines, les flavénoïdes, la mélatonine... (Genestra, 2007; Kumar et al., 2022)

Ainsi, l'équilibre entre espèces réactives de l'oxygène et antioxydants est finement régulé : on parle de balance oxydative ou homéostasie redox. Lorsque les ERO sont produits en excès ou que le système antioxydant est défaillant, c'est le stress oxydatif, qui peut engendrer de nombreux effets délétères pour la cellule et être ainsi associé à de multiples pathologies. Le stress oxydatif est majoritairement associé à des maladies chroniques et dégénératives (dont les maladies de Parkinson et d'Alzheimer), à des cancers ainsi qu'à un processus de vieillissement anticipé (Pham-Huy et al., 2008). Il a également été impliqué dans l'étiologie de l'infertilité masculine et féminine (Agarwal et al., 2012; Aitken, 2020; Barati et al., 2020). Les lésions induites par le stress oxydatif, appelées dommages oxydatifs, sont produits de manière stochastique et peuvent concerner différents composés cellulaires

: les protéines, les lipides, les carbohydrates et l'ADN lui-même, ce qui a un fort impact sur la prolifération et la survie cellulaire.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement aux dommages oxydatifs de l'ADN, reconnus pour avoir un impact fort sur la fonctionnalité des cellules et même moduler l'expression génique, ce qui fait qu'ils sont considérés comme des marques épigénétiques.

B) Lésions oxydatives de l'ADN et 8-oxoguanine

1) L'oxydation de l'ADN

L'apparition de dommages oxydatifs de l'ADN est un phénomène majeur, même en conditions physiologiques puisqu'il concerne plusieurs milliers de bases de l'ADN par jour, dans chacune de nos $\sim 10^{13}$ cellules (Lindahl and Barnes, 2000). Les lésions générées sont multiples (plus d'une centaine) et de natures très diverses en fonction de la cible de l'attaque radicalaire. On peut citer : les modifications de bases, la formation de sites abasiques, les pontages inter- ou intra-chromosomique, les cassures simples ou doubles brins de l'ADN et la formation d'adduits avec des protéines ou des dérivés lipidiques (Cooke et al., 2003; Ravanat et al., 2012)...

Les réponses cellulaires à la présence de dommages oxydatifs peuvent être nombreuses et sont très variables en fonction de leur nombre et du type cellulaire concerné. La plupart du temps, les lésions oxydatives de l'ADN engendrent des perturbations de la transcription et de la maturation des ARN, des modifications de la chromatine, une déstabilisation du réplisome et des erreurs au cours de la réplication (insertion, délétion et transversions), le tout pouvant conduire à des altérations du cycle cellulaire et entraîner les cellules vers les voies de l'apoptose ou de la sénescence (Jackson and Bartek, 2009; Nowsheen and Yang, 2012). Ainsi, les lésions oxydatives de l'ADN, dues à des processus métaboliques à l'intérieur de la cellule ou à des facteurs environnementaux, peuvent compromettre la capacité de la cellule à remplir ses fonctions physiologiques, ce qui la prédispose sensiblement à l'instabilité génomique et peut conduire, à l'échelle de l'individu, à de la tumorigenèse ou au développement de diverses pathologies humaines (Jackson and Bartek, 2009).

Pour lutter contre les lésions oxydatives de l'ADN qui sont de vraies menaces pour la cellule, un ensemble de mécanismes efficaces et spécialisés, regroupés sous le terme DDR (*DNA-damage response*), est chargé de détecter et signaler ces dommages puis de coordonner leur réparation par le recrutement de multiples effecteurs. Les principales voies de réparation des dommages oxydatifs sont synthétisées dans la figure 28).

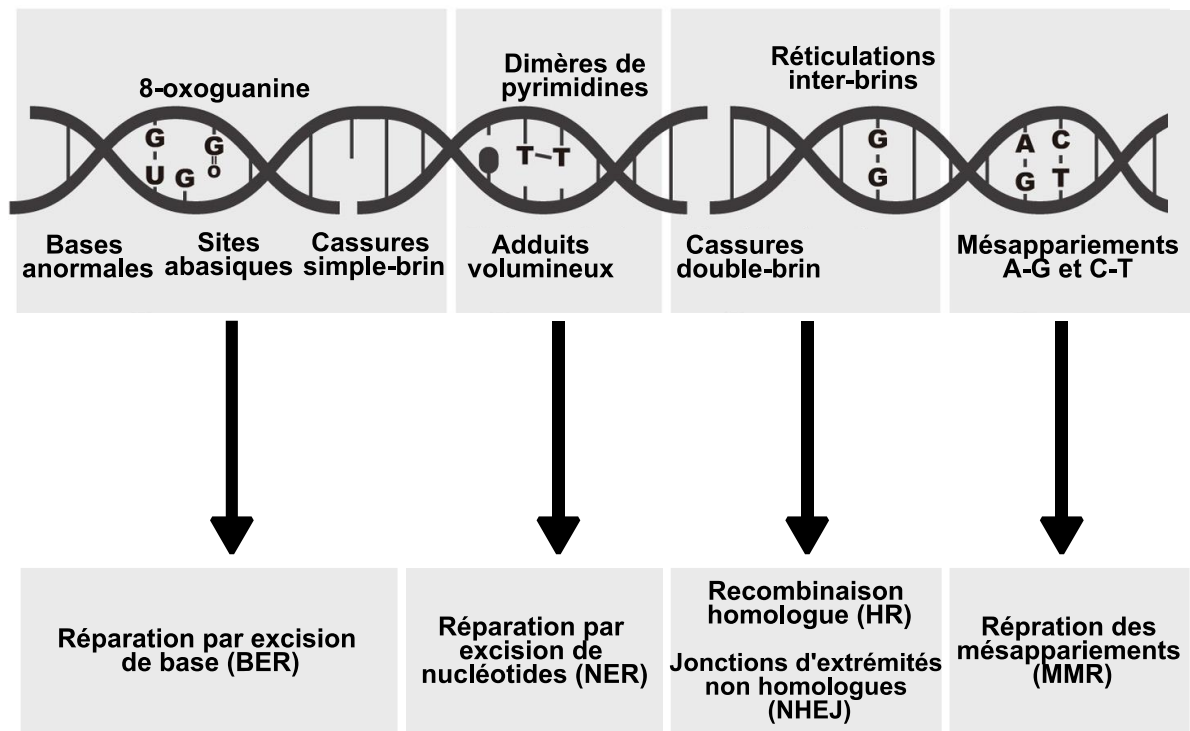


Figure 28. Les principales voies de réparation des dommages à l'ADN.

Les lésions oxydatives de l'ADN sont une vraie menace pour la cellule. Un ensemble de mécanismes, regroupés sous le terme DDR (DNA damage response), est chargé de détecter et de réparer ces dommages. Sur ce schéma sont présentés lésions de l'ADN les plus fréquentes (en haut) et leurs voies de réparation majoritaires (en bas). D'après Tasaki et al. (2018).

2) La 8-oxoguanine

Chacune des bases azotées de l'ADN (puriques comme pyrimidiques) peut être touchée par l'oxydation. De par son faible potentiel d'ionisation, la guanine présente une sensibilité particulière à l'oxydation, ce qui conduit à la formation d'un grand nombre de composés oxydés (Pratviel and Meunier, 2006). Le produit d'oxydation de la guanine le plus connu est la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (aussi appelée 8-oxoguanine et abrégée 8OdG)(Figure 29A). Cette lésion oxydative est la plus étudiée pour plusieurs raisons : 1/ c'est la première à avoir été découverte dans l'ADN, lors de la caractérisation des molécules cancérogènes, puis associée au stress oxydatif. Depuis, elle est largement utilisée comme biomarqueur de l'oxydation (Ravanat et al., 2012); 2/ c'est un, si ce n'est le, produit d'oxydation de l'ADN le plus abondant, généré par tous les types d'ERO (Epe, 2002, 1996) ; 3/ elle présente une grande capacité à engendrer de la mutagenèse et des altérations fonctionnelles dans la cellule (détaillé dans la suite de ce manuscrit). La 8-oxoguanine peut être produite directement au niveau de l'ADN (8OdG) ou de l'ARN (appelée 8-hydroxyguanosine ou o^8G), ainsi qu'au niveau des nucléotides libres (nommés 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ou 8-oxo-dGTP), incorporés au cours de la réplication ou de la transcription. On estime qu'environ 1 000 lésions de 8OdG peuvent être formées par cellule et par jour et jusqu'à 100 000 dans les cellules cancéreuses (Brégeon and Doetsch, 2011; Lindahl and Barnes, 2000).

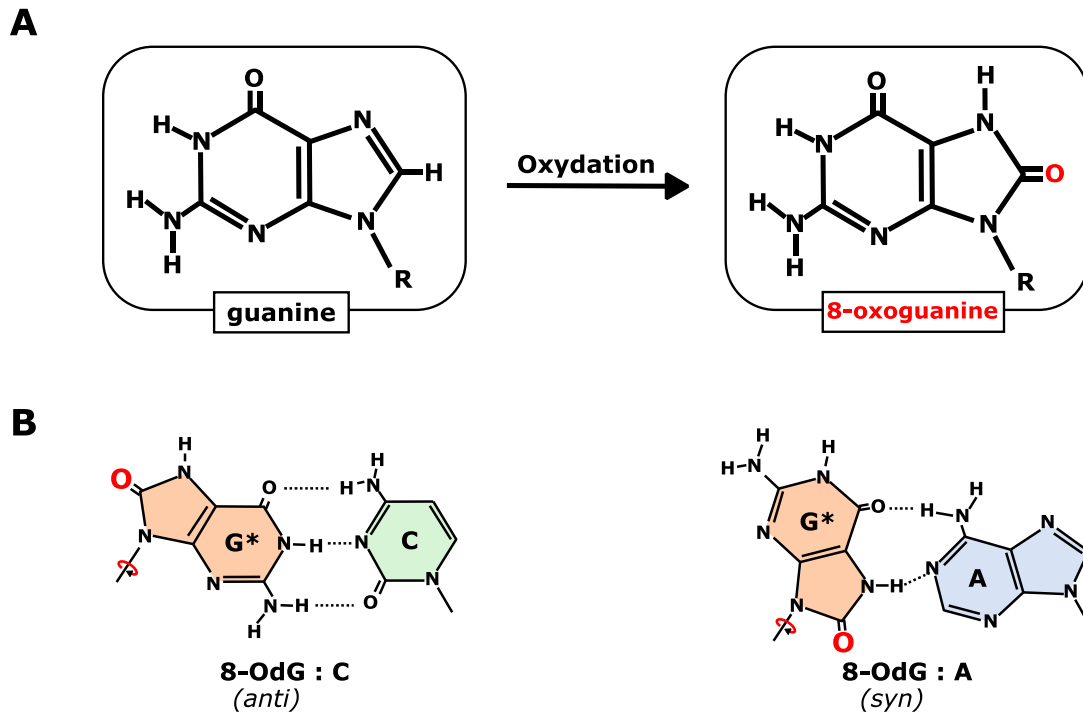


Figure 29. Formation et appariement de la 8-oxoguanine.

A) L'oxydation de la guanine par les espèces réactives de l'oxygène induit la formation de la 8-oxoguanine et modification de sa propriété d'appariement des bases. B) La 8-oxoguanine s'apparie aussi bien avec une adénine dans sa conformation anti qu'avec une cytosine dans sa conformation syn. Adapté de Nakabeppu (2014).

Les lésions 8OdG peuvent être des événements ponctuels et dispersés sur la chromatine : on parle de lésions simples ou isolées ; ou regroupées, sur deux ou plusieurs bases contiguës, sur le même brin (lésions en tandem) ou sur des brins opposés, pouvant même être formées en cascade à partir d'un seul événement radicalaire. La présence d'une 8OdG rend les bases de l'ADN avoisinantes plus sujettes à l'oxydation et représente un "point chaud" de dommages oxydatifs de l'ADN (Kim et al., 2004; Koizume et al., 1998). Ainsi, dans la plupart des cas, l'un des dommages au sein d'une lésion complexe est une 8-oxoguanine, associée à d'autres types de lésions de l'ADN comme des cassures des brins de l'ADN ou des sites abasiques (Bourdat et al., 2000; Box et al., 2001). Ces lésions groupées et complexes ont un grand impact sur la structure et la dynamique d'ouverture de la chromatine. Cela peut notamment conduire, par induction d'une forte courbure, à la perte d'interaction entre la 8OdG et la base située sur le brin complémentaire, et peut affecter le taux et la fidélité de la réparation de l'ADN (Budworth et al., 2002; David-Cordonnier et al., 2001; Georgakilas et al., 2013; Goodhead, 1994; Madison et al., 2022; Zálešák et al., 2014).

Il existe assez peu d'étude concernant la o^8G , le produit d'oxydation de la guanine le plus rencontré au niveau de l'ARN, ce qui fait que ses fonctions et son mécanisme de réparation sont largement inconnus. Pourtant, l'ARN semble particulièrement réactif et susceptible à l'oxydation, notamment par sa structure, simple brin et dépourvue d'histones (Kong and Lin, 2010; Tanaka and

Chock, 2021). Malgré son caractère transitoire, l'ARN est impliqué dans de nombreux processus biologiques, en particulier la transmission et la régulation de l'information génétique. Son oxydation peut conduire à divers dysfonctionnements, comme au cours de la traduction des ARNm, où une inhibition globale, des erreurs de fidélité ou des terminaisons prématurées ont été observées, aboutissant à des polypeptides aberrants ou manquants (Ding et al., 2004; Shan et al., 2007, 2003; Tanaka et al., 2007). Dans certaines conditions, l'ARN oxydé peut également agir sur plusieurs voies de signalisation, notamment celles de la réponse inflammatoire et de l'apoptose (Choi et al., 2007; Ding et al., 2007; Ishii et al., 2018; Tanaka and Chock, 2021).

Autant au niveau de l'ADN que de l'ARN les produits d'oxydation de la guanine ont été associés à diverses pathologies, notamment liées au vieillissement, neurodégénératives ou cardiovasculaires, même si la causalité directe et les mécanismes sous-jacents restent parfois à élucider (Anene-Nzelu et al., 2022; Hahm et al., 2022; Kong and Lin, 2010; Nakabeppu et al., 2006; Nelson and Keller, 2007; Radak and Boldogh, 2010). Un des effets majoritaires de la 8OdG au niveau cellulaire se déroule au cours de la réplication, c'est ce que nous allons évoquer maintenant.

3) La 8-oxoguanine en réplication

Il arrive que les lésions oxydatives de l'ADN soient produites pendant la phase S, ou qu'elles n'aient pas été réparées avant la réplication, en particulier dans des conditions de stress oxydatif. Des études structurales démontrent que la 8OdG isolée peut adopter deux conformations dans le site actif des ADN polymérases répliquatives : la conformation *anti* permet un appariement de base correct avec une cytosine ; dans sa conformation *syn*, la 8OdG présente une grande capacité à imiter fonctionnellement la thymine, ce qui aboutit à un appariement de Hoogsteen avec une adénine (Figure 29B). Lors du cycle de réplication suivant, cette erreur d'appariement conduira à une transversion GC→TA (Cheng et al., 1992). Ainsi, la 8OdG est reconnue comme lésion mutagène, dont les transversions sont transmissibles à la descendance si elles surviennent dans la lignée germinale et qui peuvent conduire au développement de cancers ou de diverses pathologies (van den Boogaard et al., 2021; Viel et al., 2017).

Même si la 8OdG n'est pas considérée en soi comme une lésion bloquante pour la fourche répliquative, un ralentissement transitoire de la réplication juste après l'appariement d'une 8OdG a été observé, en particulier quand celle-ci est correctement couplée à une cytosine (Shibutani et al., 1991). Pourquier *et al.* ont, quant à eux, évoqué l'effet de la 8OdG sur un acteur important de la réplication (et de la transcription) : la topoisomérase 1 (TOP1). TOP1 est chargée de réaliser un clivage transitoire de l'ADN afin de relâcher et dérouler la chromatine, ce qui est strictement nécessaire pour assurer le bon déroulement de la réplication. La présence de 8OdG augmente l'affinité de TOP1 pour l'ADN et

favorise localement sa surcharge, induisant un clivage anormal et excessif des brins d'ADN (Pourquier et al., 1999). De même, la proximité et la multiplicité des dommages dans une région, dont des 8OdG, ou des sites abasiques, vont induire des changements de conformation de l'ADN, ce qui va bloquer la progression de la fourche de réplication. Que ce soit par l'augmentation de la liaison TOP1-ADN ou par la perturbation de la structure tridimensionnelle de la chromatine, le ralentissement voire l'arrêt de la fourche de réplication peut induire une cascade d'effets cytotoxiques, dont la formation de cassures doubles brins (CDB), des perturbations de la recombinaison homologe (mécanisme ubiquitaire de réparation des CDB), des arrêts du cycle cellulaire (liés à la présence de CDB) et de la mutagénèse, pouvant aboutir à la mise place du programme cellulaire d'apoptose (Coluzzi et al., 2019; Harper et al., 2010; Sedletska et al., 2013).

C) Mécanismes de défense et réparation contre la 8OdG

Etant donné les nombreux effets délétères auxquels la 8OdG peut être associée, il existe plusieurs mécanismes afin de prévenir et/ou réparer son incorporation dans l'ADN.

1) Le Base Excision Repair

La voie de réparation préférentielle des lésions oxydatives de l'ADN isolées et peu volumineuses est la réparation par excision de base (*Base Excision Repair* - BER). Cette voie, aussi capable de réparer les produits issus d'alkylation et de désamination de bases, se déroule en quatre grandes étapes (Figure 30) (Caldecott, 2020; Lee and Kang, 2019) :

- L'initiation de la réparation se fait par une ADN glycosylase, chargée de repérer la lésion et de l'exciser.
- Le site abasique ainsi formé sera reconnu par l'endonucléase apurinique/apyrimidique 1 (APE1) qui se fixe pour former une extrémité 3'-OH.
- L'ADN polymérase β (POL β) s'appuiera sur cette extrémité pour intégrer une nouvelle base non endommagée.
- Le tout sera ligaturé par l'ensemble ADN ligase III / XRCC1 (*Scaffold Protein X-Ray Repair Cros Complementing 1*)

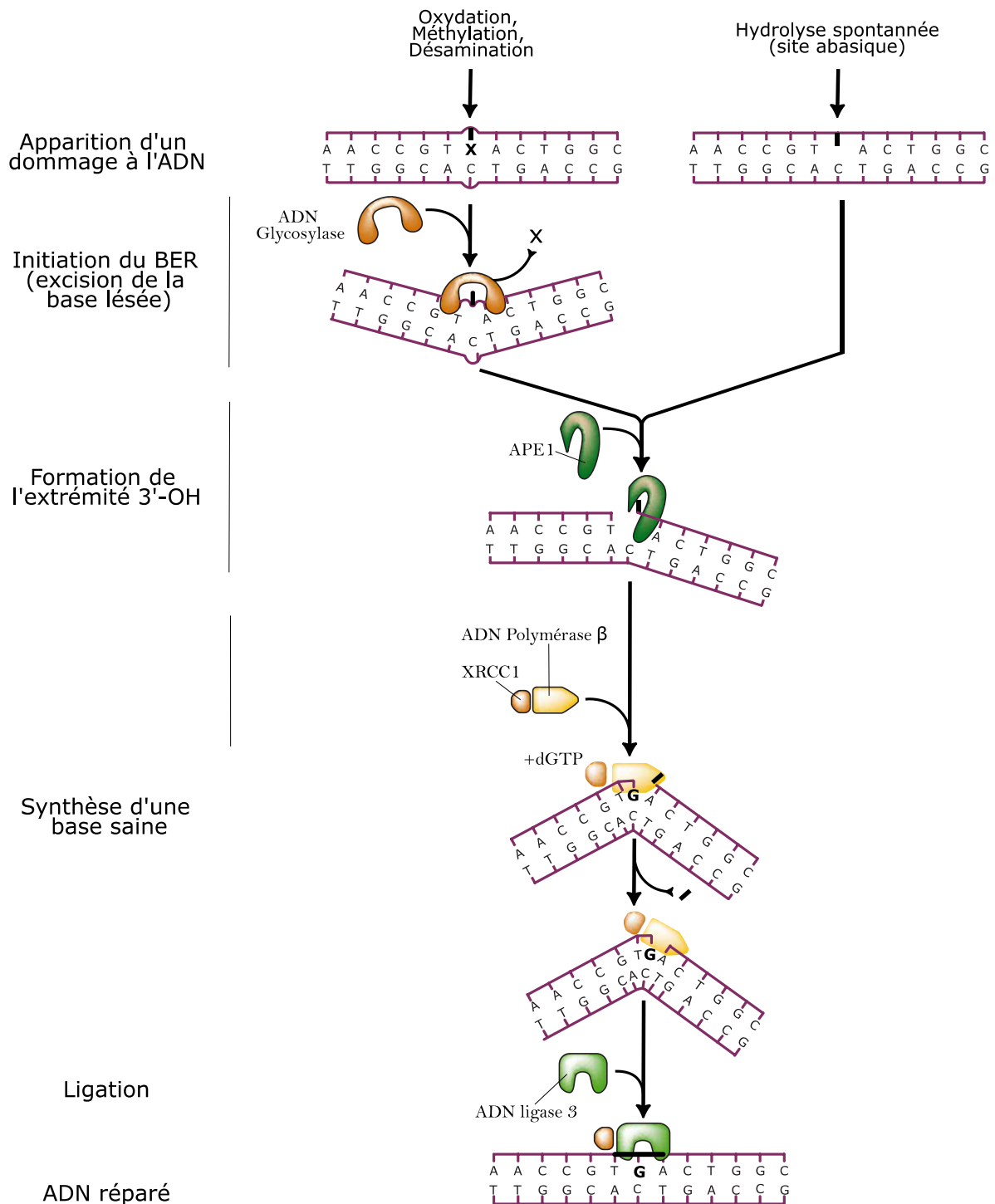


Figure 30. La réparation par excision de base (voie de synthèse courte).

Les dommages à l'ADN sont reconnus et excisés par des ADN glycosylases spécifiques ce qui laisse place à un site abasique. Le site abasique peut également être induit directement par hydrolyse spontanée. APE1 est chargé de se fixer au site abasique afin de former une extrémité 3'-OH permettant à l'ADN polymérase β de synthétiser une nouvelle base non endommagée. Le tout sera ligaturé par l'ADN ligase III. L'ADN est de nouveau indemne. D'après Hoeijmakers (2001).

Au nombre de onze chez les mammifères, les ADN glycosylases sont des enzymes spécifiques de leur substrat (Jacobs and Schär, 2012). On peut citer, la *thymine DNA glycosylase* (TDG), chargée d'éliminer la 5fC et la 5caC, produits issus de la déméthylation de la 5mC, alors que la 8OdG sera prise en charge par la *8-oxoguanine DNA glycosylase 1* (OGG1). L'invalidation génétique d'une ADN glycosylase chez la souris entraîne généralement un phénotype assez modéré (à l'exception de la TDG) contrairement à l'invalidation des gènes codants pour APE1, POL β ou l'ADN ligase 3, responsables de létalité embryonnaire (Cortellino et al., 2011; Klungland et al., 1999; Puebla-Osorio et al., 2006).

Deux équipes, celles de Klungland et de Minowa, ont produit, à la fin des années 1990, un modèle de souris déficientes pour *Ogg1* (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). Celles-ci sont totalement viables et fertiles et ne présentent aucun phénotype visible. Toutefois, en l'absence de réparation, ces animaux présentent une augmentation du nombre de 8OdG dans leur génome, particulièrement dans le foie, de 2 à 5 fois supérieure à celle retrouvée chez les individus contrôles. Les souris *Ogg1*^{-/-} ne présentent qu'un taux de mutation spontanée modérément élevé (2 à 3 fois) et ne développent pas de tumeur (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000; Osterod et al., 2001). En revanche, ces animaux présentent une sensibilité exacerbée en cas de stress : des dysfonctionnements métaboliques sont observés chez les souris *Ogg1*^{-/-} exposées à une alimentation riche en graisses, conduisant à une obésité et aux pathologies associées (Sampath et al., 2012); de même, une irradiation aux ondes ultra-violet de type B (UVB) ou une exposition à différentes substances génotoxiques induit, chez ces souris, une carcinogenèse accrue, dont les principaux organes touchés sont le foie, les poumons et les systèmes digestifs et urinaires (Takehashi et al., 2017; Kunisada et al., 2005). Chez l'Homme, même si cela reste sujet à controverse, plusieurs études cas-contrôles rapportent que certains polymorphismes du gène *OGG1* ainsi qu'une activité réduite de la protéine OGG1 pourrait induire une susceptibilité accrue de développer divers cancers (oral, colorectal, de la prostate ou du poumon notamment) (Geng et al., 2014; Ghelmani et al., 2021; Ishida et al., 1999; Paz-Elizur et al., 2003; Sugimura et al., 1999; Tata et al., 2022; H. Xu et al., 2022).

2) Les autres mécanismes

En dehors du BER, initié par OGG1, il existe deux autres mécanismes principaux permettant d'échapper à la présence de guanines oxydées dans le génome (Paz-Elizur et al., 2003).

Tout d'abord, on peut citer l'enzyme *MutT homologue 1* (MTH1), impliquée dans la prévention de l'incorporation, en cours de synthèse, de la guanine libre oxydée 8-oxo-dGTP. Pour cela, MTH1 est chargée d'hydrolyser la 8-oxo-dGTP en 8-oxo-dGMP, la rendant inutilisable par l'ADN polymérase (Nakabeppu, 2001) (Figure 31).

D'autre part, comme expliqué précédemment, la 8OdG peut être malencontreusement appariée avec une adénine au moment de la réplication. Il existe alors un mécanisme dit « de relecture », comportant deux aspects : d'un côté, l'ADN glycosylase *MutY homologue* (MUTYH) est chargée de retirer l'adénine mésappariée en face d'une 8OdG (Banda et al., 2017). Cela laissera place à un site abasique, pris en charge par le BER (avec l'action de l'ADN polymérase λ cette fois) afin d'apposer une cytosine face à la 8OdG, celle-ci pouvant alors être reconnue et excisée par OGG1. De l'autre, lorsqu'une 8-oxo-dGTP est incorporée face à une adénine au cours de la réplication, l'activité du *mismatch repair* (MMR) permet de restaurer la paire de bases T:A d'origine (Colussi et al., 2002) (Figure 31). Ces deux mécanismes sont interconnectés puisqu'une des protéines du MMR, la *MutS Homologue 6* (MSH6), est capable d'interagir physiquement avec MUTYH afin de promouvoir son activité (Gu et al., 2002).

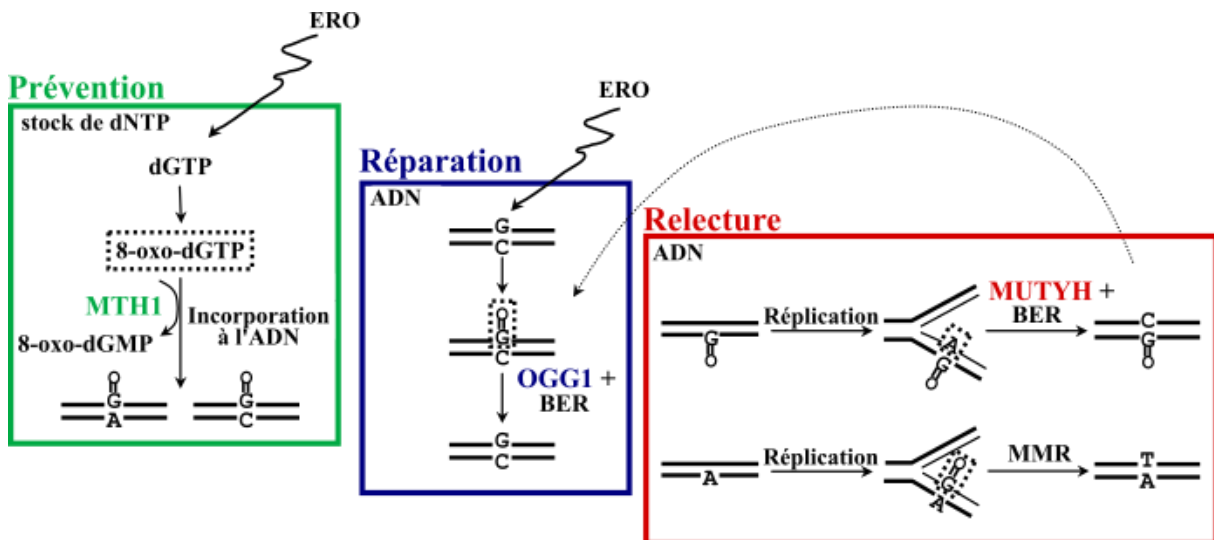


Figure 31. Les principaux mécanismes de réparation de la 8-oxoguanine.

La prévention implique l'hydrolyse de la 8-oxo-dGTP catalysée par MTH1 afin d'empêcher son incorporation dans l'ADN par les ADN polymérases. La réparation nécessite la réparation par excision de bases (BER) initiée par OGG1 afin de ré-apposer une guanine non oxydée face à la cytosine. La relecture opère sur le mésappariement 8-oxoG:A. Lorsque l'adénine se trouve dans le brin d'ADN nouvellement synthétisé, il est éliminé par MUTYH, ce qui permet la formation d'une paire 8-oxoG:C prise en charge OGG1. Lorsque l'adénine se trouve dans le brin matrice, le 8-oxoG peut être éliminé par le *mismatch repair* (MMR). Adapté de Paz-Elizur et al. (2008)

Chez la souris, l'invalidation conjointe d'*Ogg1* et de *Mutyh*, comme la triple déficience d'OGG1, MUTYH et MTH1, engendre une accumulation majeure de 8OdG au niveau de l'ADN dont découle une exacerbation de la mutagenèse, y compris dans la lignée germinale, et l'apparition de multiples cancers chez plus de la moitié des souris (Ohno et al., 2014; Russo et al., 2004; Xie et al., 2004). Cela réduit considérablement la durée de vie de ces animaux puisque plus de la moitié des souris meurent avant leurs 10 mois. Ces expériences insistent donc sur le rôle majeur des lésions oxydatives de type 8OdG comme des facteurs mutagènes et tumorigéniques et mettent en avant la fonction primordiale des trois principales voies de réparation : OGG1, MUTYH et MTH1.

D'autres mécanismes de soutien, largement minoritaires, sont capables de prendre en charge la 8OdG :

- Dans le cadre de lésions complexes, la 8OdG peut être prise en charge par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair* – NER) (Reardon et al., 1997)
- Deux autres glycosylases, les *nei endonuclease VIII-like 1* et *3* (respectivement NEIL1 et NEIL3), sont capables d'exciser la 8OdG au niveaux de structures secondaires particulières de l'ADN simple brin, où OGG1 est particulièrement peu efficace. C'est le cas au niveau des télomères, lorsque la 8OdG est incluse dans un repliement tridimensionnel de la chromatine appelé G-quadruplex, ou à proximité de l'extrémité 3' d'une cassure simple brin (Ferino and Xodo, 2021; Parsons et al., 2005; Zhou et al., 2013).

Même si la majorité est assurée par OGG1, on observe donc une redondance des activités de réparation des lésions oxydatives de type 8OdG, ce qui souligne le fait que la présence de 8OdG est vraiment délétère pour la cellule et peut avoir des impacts physiologiques conséquents.

D) La 8OdG et OGG1, des rôles épigénétiques

Outre son effet mutagène, la 8OdG est reconnue comme marque épigénétique à part entière. En effet, sa présence et sa réparation peuvent agir de manière directe et indirecte sur la transcription. Des études par séquençage ont permis de révéler que : 1/ 72% des promoteurs de gènes chez l'humain sont des séquences à haute teneur en GC ; 2/ la répartition de la 8OdG le long du génome est non aléatoire puisqu'une accumulation de 8OdG est observée dans les régions régulatrices de gènes telles que les promoteurs ou les *enhancers* (Amente et al., 2019; An et al., 2021; Ding et al., 2017; Poetsch et al., 2018; Wu et al., 2018).

Comme au cours de la réplication, une 8OdG présente dans la séquence codante peut être mal reconnue par les ARN polymérases lors de la transcription. Brégeon *et al.* ont montré, dans la bactérie *Escherichia coli*, qu'en face de la 8OdG pouvait aussi bien être ajoutée une cytosine (mécanisme normal) qu'une adénine, ce qui induit une transversion C => A dans l'ARNm. De même, l'ARN

polymérase peut simplement glisser sans incorporer de base, ce qui induit une délétion d'un nucléotide (Brégeon et al., 2003). Ceci a été confirmé chez les mammifères : on parle de mutations transcriptionnelles, ce qui peut conduire à la traduction de protéines erronées ou à des erreurs au cours de l'épissage étant donné que les motifs d'épissage alternatif les plus conservés comportent des guanines (Brégeon et al., 2009; Marietta and Brooks, 2007; Paredes et al., 2017). Les mutations génomiques et transcriptionnelles dues à une 8OdG ont été associées à des modifications phénotypiques au niveau cellulaire, et, de manière globale, à de la tumorigénèse et de la dégénérescence neuronale (Basu et al., 2015; Brégeon and Doetsch, 2011; Saxowsky et al., 2008). Par ailleurs, les ARN polymérases semblent capables de détecter les lésions 8OdG au cours de la transcription et d'initier leur réparation couplée à la transcription (TCR - *transcription coupled repair*) (Guo et al., 2013; Le Page et al., 2000b, 2000a). Ce processus semble nécessiter l'action d'OGG1, en particulier pour la réparation du brin non transcrit et nous laisse penser qu'un contrôle coordonné de la transcription et de la réparation de l'ADN est indispensable pour préserver l'identité et les fonctions cellulaires.

D'autre part, il est intéressant de constater qu'un grand nombre de séquences régulatrices et promotrices de la transcription sont riches en guanines et, par ce biais, sensibles à l'oxydation. Ramon *et al.* ont évoqué, dès 1999, l'inhibition de la transcription par la présence de 8OdG au niveau des séquences régulatrices des gènes (Ramon et al., 1999). Ils se sont intéressés à un facteur de transcription, la *specificity protein 1* (SP1), capable de se fixer à un domaine riche en guanine, appelé *GC-box* (5'-GGGGCG-GGG-3'), présent dans les promoteurs de divers gènes cellulaires et viraux. Ils ont étudié, *in vitro*, par une expérience de retard sur gel (*electrophoretic mobility shift assay* – EMSA), la fixation de Sp1 à différents oligonucléotides de synthèse dans lesquels une des guanines de la *GC-box* a été substituée par une 8OdG. Ils ont observé une diminution de 70 à 95% de la fixation de Sp1 par rapport à l'oligonucléotide contrôle, ce pourcentage variant en fonction de la position de la guanine oxydée sur l'oligonucléotide. D'autres études ont par la suite confirmé que la présence d'une 8OdG ou d'un de ses intermédiaires de réparation, notamment les sites abasiques, même sur le brin non transcrit, peuvent déréguler, de manière passive, la fixation des éléments régulateurs et, de ce fait, inhiber la transcription (Allgayer et al., 2016; Lu et al., 2004; Mk et al., 2003; S. P. G. Moore et al., 2013). A l'inverse, la 8OdG peut également avoir un rôle activateur sur la transcription *via* le recrutement de ses protéines de réparation (OGG1 et APE1 principalement), notamment dans des régions fermées et donc répressives de la chromatine. Le gène *Vegf* (*Vascular endothelial growth factor*) et le gène *Sirt1* (*Sirtuin Type 1*) sont, par exemple, concernés, dans des contextes de stress oxydatif (Antoniali et al., 2014; Pastukh et al., 2015). Des événements similaires se déroulent au niveau des promoteurs des gènes cibles du facteur de transcription NF- κ B : la fixation d'OGG1 induit des changements

architecturaux de la chromatine qui favorisent la présence de NF- κ B au niveau de l'ADN et le recrutement ciblé de la machinerie transcriptionnelle (Ba et al., 2014; Pan et al., 2016). Toutefois, comme le démontrent Hailer-Morrison *et al.*, les effets sur la transcription d'un gène peuvent être contraires en fonction de la position de la guanine oxydée dans le site de reconnaissance (Mk et al., 2003).

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'impact de la 8OdG sur la méthylation de l'ADN. Les équipes de Turk, Weitzman et Maltseva ont tour à tour démontré l'inhibition de la liaison des DNMT à l'ADN simplement par la présence d'une 8OdG au niveau des îlots CpG (mécanisme passif) (Maltseva et al., 2009; Turk et al., 1995; Weitzman et al., 1994). Gruber *et al.* ont, quant à eux, montré que la formation de duplex CpG (5mC et 8oxoG) pouvait accélérer la reconnaissance des cytosines méthylées et favoriser leur déméthylation, induisant potentiellement l'expression génique (Gruber et al., 2018). De plus, lorsqu'une méthylation a été apposée au niveau des cytosines, un mécanisme de condensation de la chromatine peut se mettre en place afin de verrouiller la répression transcriptionnelle. Celui-ci met en jeu une collaboration entre méthylation de l'ADN et méthylation des histones et est initié par la fixation de protéines, les *methyl-CpG binding proteins* (MBP), aux cytosines méthylées. Valinluck *et al.* ont montré que la présence d'une guanine oxydée (ou d'une 5hmC), aux alentours des cytosines méthylées, diminue considérablement l'affinité d'une MBP, la MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2), pouvant potentiellement ainsi aboutir à une levée de la répression transcriptionnelle (Valinluck et al., 2004). *A contrario*, O'Hagan *et al.* ont observé que la survenue de 8OdG, ou sa réparation par la voie du BER, induisait le recrutement d'un complexe protéique de *silencing* transcriptionnel de la chromatine, chargé d'hypermétyler la région et d'ôter les marques d'histones activatrices afin de réprimer localement l'expression transcriptionnelle (O'Hagan et al., 2011).

Les processus de réparation de la 8OdG, particulièrement OGG1, semblent également impliqués dans ces processus : d'après Zhou *et al.*, OGG1 est capable d'interagir et de recruter TET1, une des principales enzymes de déméthylation de l'ADN. Ils associent ce processus à une déméthylation globale de l'ADN observée suite à un stress oxydatif (X. Zhou et al., 2016). Le lien entre TET et 8OdG semble en réalité réciproque puisque la déméthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG induit la production d'ERO, pouvant aboutir à une oxydation locale de l'ADN et donc à la production de 8OdG. Sengupta *et al.* proposent d'ailleurs que l'activation de certains gènes serait ainsi dépendante de la production de dommages oxydatifs au niveau de l'ADN (Sengupta et al., 2020). Cette équipe a également observé la formation de complexes multi-protéiques associant protéines du BER (en particulier les glycosylases NEIL) et déméthylases, ce qui semble corroborer leur hypothèse et insiste, dans tous les cas, sur l'étroitesse des liens entre réparation des dommages oxydatifs et

méthylation. A l'inverse, en cas de stress oxydatif, Xia *et al.* ont constaté que la présence d'OGG1 au niveau d'une 8OdG peut également induire le recrutement de l'hélicase CDH4 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 4*) responsable de la mobilisation de protéines répressives dont les trois DNMT. Ils observent ainsi l'apposition locale d'une méthylation *de novo* de l'ADN et la répression transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs (Xia *et al.*, 2017). Ceci pourrait permettre notamment d'éliminer les cellules présentant une grande quantité de 8OdG, mais pourrait aussi être associé à la survenue de cancers.

Evidemment, l'impact de la 8OdG ne se limite pas à la méthylation de l'ADN mais concerne aussi la méthylation des histones. Un des exemples les plus courants est l'enzyme LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*), capable de déméthyliser les lysines 4 et 9 de l'histone H3. Différentes équipes ont corrélé des quantités élevées de 8OdG au niveau de séquences promotrices au recrutement de LSD1, qui par son action sur les queues des histones, aboutissait ainsi à une augmentation de la transcription. Ceci concerne divers facteurs de transcription dont Myc et les récepteurs aux œstrogènes (Amente *et al.*, 2010; Perillo *et al.*, 2008). Comme pour les TET, ces deux équipes ont observé que la déméthylation par LSD1 entraînait une augmentation des ERO, puis successivement, la formation de 8OdG, la fixation d'OGG1, le recrutement de la topoisomérase II β et qui, *in fine*, favoriserait localement la transcription.

Outre cela, la 8OdG est capable de moduler la transcription par l'intermédiaire de structures tridimensionnelles particulières, les G-quadruplex (G4). Ceux-ci sont formés dans les régions promotrices des gènes à partir de séquences riches en guanines (PQS – *potential quadruplex-forming sequences*, au moins quatre séries de guanines à proximité les uns des autres avec au moins trois guanines par séries) (Figure 32). L'incorporation d'une 8OdG dans une séquence PQS induit le recrutement d'OGG1 et la création d'un site abasique au niveau du promoteur : cela déplace l'équilibre du brin et conduit à la formation d'une structure G4 (Fleming *et al.*, 2017; Roychoudhury *et al.*, 2020). Dans la majorité des cas, les G4 agissent comme des centres recruteurs de différents facteurs de transcription, directement ou *via* la liaison d'APE1, ce qui induira finalement l'expression du gène (Cogoi *et al.*, 2018; Fleming *et al.*, 2019, 2017; Scj *et al.*, 2019; Spiegel *et al.*, 2021). La stabilisation des G4 a, quant-à-elle, été associée à la répression de gènes, notamment au niveau d'oncogènes (Cogoi *et al.*, 2014; Membrino *et al.*, 2011; Omega *et al.*, 2018; Palumbo *et al.*, 2008). En parallèle, la survenue d'un 8OdG au niveau d'un G4 peut impacter sa stabilité et donc l'expression du gène concerné. Cogoi *et al.* ont observé une dissolution de G4 au niveau du promoteur du gène KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) suite à l'apparition d'une 8OdG afin de favoriser sa réparation (Cogoi *et al.*, 2018). A l'inverse, Bielskutė *et al.* observent que la formation d'un 8OdG peut engendrer une stabilisation exacerbée de la structure G4 dans certaines régions promotrices, comme pour le gène BCL2 (B-cell lymphoma 2) (Bielskutė *et al.*, 2021). Même si les données peuvent être contradictoires,

les G4 semblent jouer un rôle clé puisque certaines régions possèdent une cinquième série de guanine en amont ou en aval de leur PQS afin de permettre la réparation de dommages à l'ADN sans perdre leur G4 et la régulation génique associée (Fleming et al., 2015). Enfin, la présence de G4 peut également influencer la méthylation de l'ADN et des histones : Mao *et al.* ont montré que DNMT1 présente une affinité de liaison plus élevée pour les G4 que l'ADN double ou simple brin environnant et qu'à l'inverse, les G4 sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de DNMT1. Ils proposent donc que DNMT1 se lie sur un G4 nouvellement formé et s'y retrouve séquestré, inhibant la méthylation de l'ADN localement (Mao et al., 2018). De manière similaire, Fee et Kennedy observent, *in vitro*, une très haute affinité de DNMT3A et 3B pour les G4 (Cree et al., 2016). Ainsi, les G4 sont impliqués dans divers processus biologiques, dont la différenciation cellulaire, comme cela a été récemment mis en évidence par l'équipe de Zyner, grâce à des approches *in vitro* sur des cellules souches embryonnaires humaines (Zyner et al., 2022). Ils montrent notamment que la stabilisation des G4 à l'aide d'outils chimiques retarde la différenciation des cellules souches. En outre, les G4 peuvent aussi être impliqués dans la réponse au stress oxydatif : en cas de stress oxydatif, l'oxydation des guanines au niveau des promoteurs induit la formation de G4 et favorise la transcription, en l'occurrence des gènes de réparation de l'ADN. Il existerait donc une boucle de rétroaction entre création et réparation des dommages, par l'intermédiaire des G4, afin de limiter les effets délétères induits par l'oxydation sur l'ADN (Fleming et al., 2018; Fleming and Burrows, 2020; Zhu et al., 2018). Chez l'humain, les promoteurs de gènes de réparation de l'ADN abritent d'ailleurs deux fois plus de séquences PQS que les autres gènes (Fleming et al., 2018).

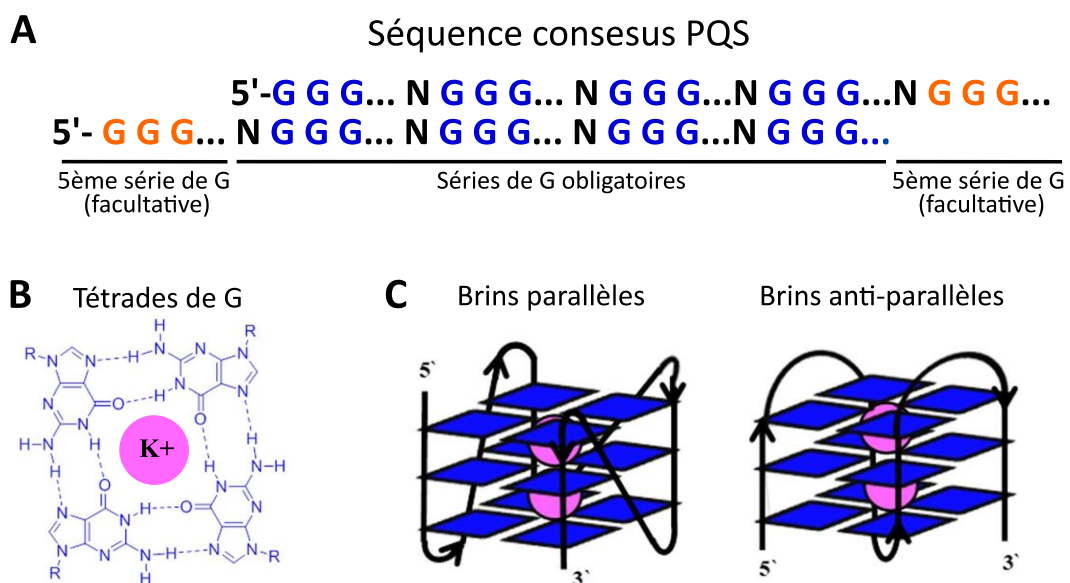


Figure 32. Les G-quadruplexes.

Certaines séquences riches en G peuvent adopter un repliement particulier appelé G-quadruplex. **A)** Séquence consensus PQS (*potential quadruplex-forming sequence*) composée d'au moins quatre séries de guanines (G) à proximité les unes des autres avec au moins trois G par séries. Une cinquième série de G peut être présente sur le côté 5' ou 3' de la séquence principale. **B)** Cette séquence particulière permet à une guanine de chaque série de se joindre afin de former une tétrade de G. **C)** Représentation graphique de G-quadruplex dans leur conformation parallèle ou anti-parallèle. D'après Fleming et Burrows (2020).

Ainsi, que ce soit de manière directe ou indirecte, la 8OdG et ses intermédiaires de réparation peuvent altérer la fidélité de la transcription et conduire, par de multiples processus, à des modifications de l'expression transcriptionnelle des gènes. De manière globale, cette marque épigénétique est plutôt associée à une activation de la transcription mais les effets rapportés peuvent être contraires car ils dépendent de la quantité de dommages oxydatifs, de la séquence d'ADN concernée par l'oxydation et des contextes génomiques et cellulaires généraux.

En conclusion, le métabolisme de l'oxygène induit la production d'espèces réactives de l'oxygène, indispensables pour le bon fonctionnement de nos cellules. Toutefois, un dysfonctionnement endogène ou diverses substances exogènes sont capables d'induire un déséquilibre de la balance ERO/antioxydants : c'est le stress oxydatif. La présence en grande quantité d'ERO induit des altérations de différents composants cellulaires dont l'ADN. La lésion oxydative majeure au niveau de l'ADN est la 8OdG, capable d'induire de nombreux effets au sein de nos cellules, (résumés en figure 33) et reconnue comme marque épigénétique à part entière (Fleming and Burrows, 2017; Seifermann and Epe, 2017). Pour contrer ces effets, plusieurs mécanismes de prévention ou de réparation existent, dont le principal est initié par une glycosylase clef, OGG1. Toutefois, l'impact d'une grande quantité de lésions oxydatives de l'ADN de type 8OdG sur la différenciation des cellules germinales et la reproduction reste un mystère à élucider.

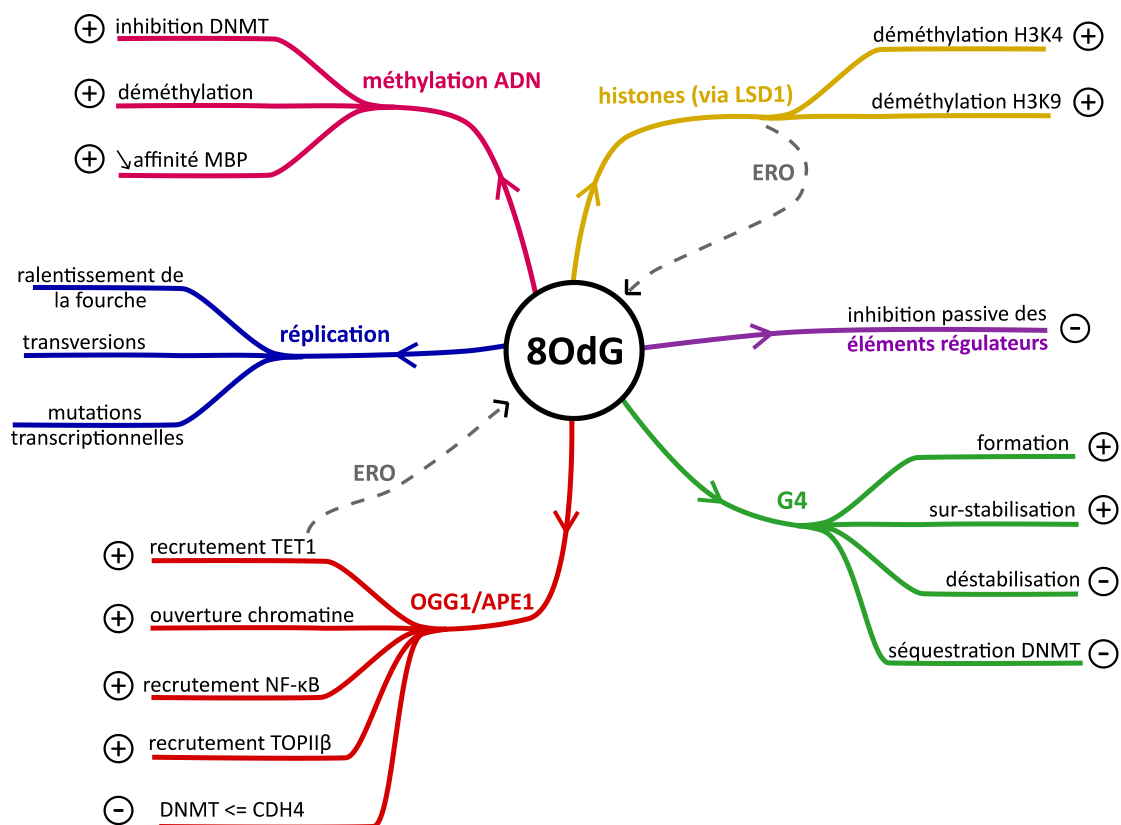


Figure 33. Schéma récapitulatif des différents effets de la 8-oxoguanine dans la cellule.

La 8OdG peut avoir différents impacts au niveau cellulaire, au niveau de la réplication, mais surtout au niveau de la transcription, de manière directe ou indirecte (méthylation de l'ADN, marques des histones, G-quadruplex), chacune des voies impactées étant représentée par une branche épaisse. Les branches fines permettent de préciser le mécanisme. Les symboles encadrés décrivent l'effet sur la transcription : + pour activation, - pour inhibition.

E) Un moyen d'étude : le KBrO₃

Etant donné le nombre et l'importance des effets induits par la 8OdG, de nombreuses équipes de recherche s'y sont intéressées. L'étude des souris déficientes pour *Ogg1* a permis d'apporter un certain nombre d'éléments de réponses. Toutefois, comme évoqué précédemment, la quantité de dommages produits par cette invalidation génique demeure marginale et les effets, notamment en terme de mutagenèse, restreints. Afin d'obtenir davantage d'informations, il était nécessaire de promouvoir le stress oxydatif chez ces souris. Un des produits les plus adaptés et, de fait, le plus utilisé, est le bromate de potassium (KBrO₃). Initialement utilisé en boulangerie comme agent de maturation de la farine, cet agent oxydant est toxique à très haute dose. Kurokawa *et al.* ont évalué la dose létale 50 (DL50) chez la souris, le rat et le hamster. Malgré de légères variations selon l'espèce ou le sexe, ils ont défini la DL50 entre 300 à 500 milligrammes de KBrO₃ par kilogrammes de poids corporel. En répétant l'expérience avec une autre espèce de rats, ils ont abaissé cette limite entre 150 et 180 mg/kg (Kurokawa *et al.*, 1990).

Une des caractéristiques principales du KBrO₃ est qu'il permet de générer des radicaux d'oxygène au niveau de l'ADN sans formation d'adduits ou de cassures de brins. Plusieurs études ont montré que les animaux traités avec du KBrO₃ accumulent des lésions oxydatives de type 8OdG (Kasai *et al.*, 1987; Sai *et al.*, 1992; Speit *et al.*, 1999; Umemura *et al.*, 2006). Avec une exposition longue ou à fortes doses, des cancers du foie, des reins ou des poumons ont été observés (DeAngelo *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 1987; Kurokawa *et al.*, 1990, 1983; Wolf *et al.*, 1998).

Deux équipes se sont intéressées à l'impact conjoint de la déficience d'*OGG1* et de l'exposition au KBrO₃ chez la souris. Arai *et al.* ont administré du KBrO₃ à une dose de 2g/L dilué dans l'eau de boisson pendant 12 semaines à des souris *Ogg1*^{+/+} et *Ogg1*^{-/-} (Arai *et al.*, 2003, 2002). Ils ont observé une augmentation d'environ 70 fois du nombre de 8OdG dans les reins des souris *Ogg1*^{-/-} par rapport au souris *Ogg1*^{+/+} ayant reçu le même traitement, sans diminution de la quantité de 8OdG 4 semaines après l'arrêt de l'exposition. Le taux de mutagenèse dans l'ADN rénal était également accru, entraînant majoritairement des transversions CG=>TA. Dans le foie, ils ont observé une multiplication du nombre de 8OdG par 26, et une augmentation de la fréquence d'apparition des mutations mais cela n'a pas altéré la capacité de régénération hépatique après hépatectomie partielle. Quelques années après, la même équipe a exposé les mêmes souris, invalidées ou non pour *Ogg1*, à du KBrO₃ concentré à une dose de 2g/L pendant 18 semaines puis à 1g/L pendant 11 semaines supplémentaires puis ils ont attendu 23 semaines avant d'euthanasier les animaux (Arai *et al.*, 2006). Ainsi, après 29 semaines de traitement, la quantité de 8OdG dans le rein a été multipliée par 250 chez les souris *Ogg1*^{-/-} par rapport aux souris témoins (*Ogg1*^{+/+} avec ou sans traitement), alors qu'elle n'a été multipliée que par 15 chez les souris *Ogg1*^{-/-} non exposées. En dehors d'une légère diminution du poids corporel et de quelques

dysfonctionnements rénaux, ils n'ont observé aucune tumeur ou prémices de lésions précancéreuses. Enfin, Jałoszyński *et al.* ont exposé des femelles âgées de 8 à 10 semaines à du KBrO₃ dilué à 2g/L dans l'eau de boisson pendant 4 jours (Jałoszyński *et al.*, 2007). Comme l'équipe d'Arai, ils observent une augmentation de la quantité de 8OdG au niveau foie (x3) et du rein (x6) chez les souris *Ogg1*^{-/-} par rapport aux souris *Ogg1*^{-/-} non exposées et se sont intéressés au rôle du facteur de transcription NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) dans la néphrotoxicité après exposition au KBrO₃. Globalement, la visée première de ces recherches étant l'étude de la génotoxicité induite par le KBrO₃, ces équipes se sont concentrées sur deux organes particulièrement sensibles aux dommages oxydatifs, le foie et le rein. De plus, ils ont exposé des souris adultes, pendant des temps parfois longs et à des doses modérément élevées. L'utilisation conjointe de l'inactivation d'*Ogg1* et de l'utilisation du KBrO₃ semble un bon modèle pour induire une nette augmentation du nombre de 8OdG, même avec une courte exposition.

Objectifs

Chez les mammifères, la reproduction sexuée repose sur la formation de gamètes haploïdes et de bonne qualité. La différenciation germinale, et particulièrement la méiose, sont des processus complexes et finement régulés, et des altérations survenant précocement, en vie fœtale ou néonatale, pourront induire des défauts de fertilité chez l'adulte. Depuis 25 ans, mon laboratoire s'intéresse à l'étude des mécanismes fondamentaux contrôlant le développement des cellules germinales et à leur altération par les perturbateurs endocriniens. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité comprendre l'impact des polluants environnementaux à caractère pro-oxydant sur la différenciation germinale, chez le mâle et chez la femelle, et étudier les mécanismes sous-jacents.

Parmi les perturbateurs endocriniens, les nombreux impacts du BPA sur la fertilité, notamment chez la femelle, sont aujourd'hui bien caractérisés. En revanche, les effets de ses analogues structuraux, composés qui ont fleuri dans le monde industriel à la suite de la réglementation relative au BPA, sont très peu décrits. Pourtant leur utilisation, et par conséquent notre exposition, ne fait qu'augmenter. Une étude pilote menée il y a plusieurs années au laboratoire a permis d'évaluer la toxicité de différents bisphénols grâce à un modèle en culture organotypique d'ovaires fœtaux de souris (étude non publiée, projet GONABIS). Parmi six bisphénols, le BADGE et le BPAF étaient ceux qui impactaient le plus le nombre total de cellules germinales après six jours de culture *in vitro*. Dans ce contexte, **le premier objectif de ma thèse a été de caractériser l'impact d'une exposition fœtale au BADGE et au BPAF sur l'ovogenèse et la folliculogenèse chez la souris**. Ces travaux, présentés en partie I, ont été initiés et réalisés en grande partie par le Dr. Abdallah. Au-delà de la description phénotypique et de la comparaison avec le BPA, nous souhaitons comprendre si un mécanisme d'action commun aux bisphénols existait et nous avons proposé l'implication des dommages oxydatifs de l'ADN. Pour cela, j'ai caractérisé la méiose fœtale et la folliculogenèse chez les souris déficientes pour OGG1, la principale glycosylase qui reconnaît et répare la 8OdG.

Dans un second temps, compte tenu de l'effet pro-oxydant de la majorité des polluants environnementaux et des effets des lésions oxydatives de l'ADN que nous avons constatés pour la fertilité femelle, **le second objectif de ma thèse était d'évaluer l'impact sur la fertilité de la survenue de lésions oxydatives de l'ADN de type 8OdG à deux moments clés de la différenciation germinale mâle**. Ces résultats, présentés en partie II, sont synthétisés sous forme d'un article scientifique et seront prochainement soumis à un journal scientifique.

En parallèle de ces études menées chez la souris, un modèle innovant mis au point au laboratoire nous permet d'étudier l'impact d'une exposition à diverses substances sur la différenciation germinale fœtale humaine et la formation de cancer testiculaire germinal. Pour se faire, les gonades sont collectées sur des fœtus humains âgés de 8 à 11 semaines de grossesse, issus d'interruptions volontaires de grossesse après consentement maternel (collaboration avec l'hôpital Antoine Béclère), puis sont greffés dans le dos de deux souris athymiques. Ainsi, nous pouvons exposer les gonades fœtales humaines à un composé donné et à son solvant pendant plusieurs semaines. Grâce à ce procédé, des études menées dans le laboratoire ont évalué l'impact de différents bisphénols et phtalates sur la différenciation fœtale humaine. Une partie de ces résultats seront présentés en discussion et dans l'article en annexe. Dans le cadre de ma thèse, j'ai initié l'exposition de testicules fœtaux humains à un pro-oxydant, le bromate de potassium. **Ainsi, un objectif complémentaire de ma thèse a été d'évaluer les effets des dommages oxydatifs de l'ADN sur le testicule fœtal humain.** Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés en partie III.

Résultats

Résultats

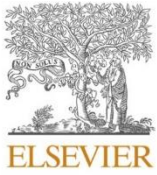
Partie I – L'exposition fœtale aux bisphénols BADGE et BPAF altère la méiose par l'oxydation de l'ADN dans les ovaires de souris

L'augmentation de l'incidence des problèmes de fertilité dans la population humaine est une préoccupation majeure dans notre société. Une des étapes critiques de la gamétogenèse est la méiose, et particulièrement la prophase I de méiose, au cours de laquelle les chromosomes homologues s'apparient et échangent de manière réciproque du matériel génétique via la formation des crossing-over. Le déroulement correct de la prophase I méiotique, et notamment l'existence de ces liens physiques au sein de chaque paire d'homologues, est un prérequis à la bonne ségrégation des chromosomes homologues en métaphase I et à la formation de gamètes euploïdes. Chez la femelle, la méiose débute pendant la vie fœtale puis les ovocytes sont arrêtés au stade diplotène aux alentours de la naissance, ce qui fait du développement embryonnaire une période de grande sensibilité.

De nombreux polluants environnementaux sont connus pour entraîner des altérations de la prophase I de méiose, dont certains ayant une capacité de perturbation endocrine. Un des composés les plus étudiés est le Bisphénol A (BPA), reconnu comme pouvant altérer la folliculogénèse et la prophase I, notamment la recombinaison homologue. Le mécanisme de toxicité du BPA demeure mal compris mais son interférence avec la signalisation des récepteurs aux œstrogènes a été évoqué à comme cause putative de ces défauts. L'utilisation du BPA étant actuellement restreinte, l'usage de divers analogues structuraux du BPA a considérablement augmenté en industrie, de sorte que plusieurs d'entre eux ont été retrouvés dans les fluides humains. Toutefois, les connaissances actuelles sur les effets toxicologiques potentiels des alternatives au BPA sont restreintes.

Ainsi, le but de ce travail était d'étudier les effets d'une exposition fœtale à deux bisphénols analogues structuraux du BPA, le BADGE et le BPAF, sur les ovocytes de souris. Pour cela, des souris gestantes ont été exposées à l'un ou l'autre de ces polluants, ou au solvant, dilué dans l'eau de boisson à une concentration de 10 μ M, pendant toute la deuxième moitié de la gestation (de 10,5jpc à la naissance). Cette étude montre les effets délétères du BADGE et du BPAF sur l'ovogénèse et la folliculogénèse. Des souris exposées *in utero* au BADGE et au BPAF présentent de nombreux défauts ovocytaires et de folliculogénèse après la naissance. Nous avons en effet observé un appauvrissement folliculaire, la formation de nombreux follicules multi-ovocytaires, une augmentation du nombre de chiasmas corrélée à des problèmes d'aneuploïdies ovocytaires à la reprise de méiose. L'observation de ces défauts ovocytaires semblent découler d'altérations lors de la prophase I de méiose puisque

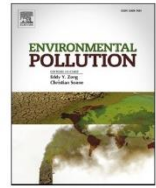
l'exposition aux bisphénols induit un retard de l'initiation et de la progression méiotique ainsi qu'un nombre augmenté de crossing-over (signalisés par la présence des foyers MLH1). De manière intéressante, une exposition pré-méiotique (de 10,5 à 14,5 jpc) aux bisphénols est suffisante pour induire des défauts méiotiques. Ceci suggère que ces défauts découlent d'altérations germinales en amont de l'entrée en méiose. Nous avons notamment observé plusieurs altérations identifiées dans les CGP ovariennes exposées au BADGE ou au BPAF : 1/ la déméthylation de l'ADN ainsi que l'acquisition de la compétence gamétique semble retardée ; 2/ une augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN ; 3/ une altération du programme transcriptionnel méiotique associé à des défauts d'épissage des ARNm. L'observation conjointe de ces défauts dans la dynamique de déméthylation et des altérations transcriptionnelles associés à une augmentation des lésions oxydatives nous a amené à proposer, pour la première fois, que ces défauts puissent découler de dommages oxydatifs de l'ADN, induits par les bisphénols dans les cellules germinales primordiales. En l'absence de la principale enzyme de réparation de la 8-OdG, l'ADN glycosylase OGG1, nous retrouvons effectivement un délai dans l'initiation méiotique ainsi qu'une augmentation du nombre d'évènements de recombinaison. L'utilisation d'un antioxydant, le N-acétylcystéine, conjointement à l'exposition aux bisphénols restaure la dynamique d'entrée en méiose et confirme le lien entre dommages oxydatifs et mise en place du programme méiotique.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



Foetal exposure to the bisphenols BADGE and BPAF impairs meiosis through DNA oxidation in mouse ovaries^{☆,☆☆}

Sonia Abdallah^{a,b,c}, Amandine Jampy^{a,b,c}, Delphine Moison^{a,b,c}, Margaux Wieckowski^{a,b,c}, Sébastien Messiaen^{a,b,c}, Emmanuelle Martini^{a,b,c}, Anna Campalans^{a,b}, Juan Pablo Radicella^{a,b}, Virginie Rouiller-Fabre^{a,b,c}, Gabriel Livera^{a,b,c}, Marie-Justine Guerquin^{a,b,c,*}

^a Université Paris-Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, Fontenay aux Roses, France

^b Université de Paris-Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, Fontenay aux Roses, France

^c Laboratory of the Development of the Gonads, France

*Éléments sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

Partie II – Les lésions oxydatives de l'ADN produites pendant la vie néonatale altèrent de façon permanente la gamétogenèse chez la souris et entraînent des mutations ponctuelles transmissibles à la progéniture.

Notre exposition aux polluants environnementaux a largement augmenté au cours du siècle dernier. Nous sommes aujourd'hui continuellement exposés à une diversité de composés chimiques et physiques susceptibles d'affecter notre santé et notre vie reproductive. L'infertilité, qui touche 15 à 25 % des couples en France, découle majoritairement d'anomalies qui surviennent au cours de la différenciation des cellules germinales mâles, sans que nous ne comprenions vraiment les mécanismes sous-jacents.

Au cours de la différenciation germinale mâle, on peut mettre en avant trois étapes clés : l'acquisition du programme transcriptionnel gamétique (vie fœtale), la mise en place du pool de cellules souches spermatogoniales (vie néonatale) et la méiose, avec la formation de cassures double-brins programmées et leur réparation par recombinaison homologue (vie adulte). Celles-ci dépendent de la mise en place de programmes transcriptionnels précis, reposant sur des remaniements épigénétiques, et notamment de la méthylation de l'ADN, finement régulés. Une exposition fœtale ou néonatale à des polluants environnementaux, notamment aux perturbateurs endocriniens, est connue pour être particulièrement délétère pour les cellules germinales et la fertilité à l'âge adulte.

La plupart des polluants environnementaux partagent un caractère pro-oxydant, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'induire un déséquilibre oxydatif au sein de nos cellules. Cela aboutira, au niveau de l'ADN, à la production de lésions oxydatives, dont la plus couramment rencontrée : la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-OdG), produit d'oxydation de la guanine. Outre son effet mutagène, la 8-OdG et ses produits de réparation peuvent avoir des répercussions épigénétiques directes ou indirectes sur la transcription, notamment en interférant avec les enzymes impliquées dans l'apposition et l'effacement de la méthylation des cytosines. Nos précédents travaux sur l'ovaire ont suggéré un lien fort entre la formation de dommages oxydatifs de l'ADN dans les cellules germinales primordiales, l'altération de la mise en place du programme méiotique et du bon déroulement de la méiose.

Ainsi, l'objectif de ces travaux était de décrire l'impact des dommages oxydatifs de type 8-OdG sur chacune des étapes clés de la différenciation des cellules germinales mâles et leurs effets à long-terme sur la fertilité. Pour cela, nous avons combiné un modèle génétique, avec l'utilisation d'une souris invalidée pour la *8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1)*, l'ADN glycosylase chargée de reconnaître les lésions de type 8-OdG et d'initier leur réparation, et un outil chimique, le bromate de potassium (KBrO₃), un puissant pro-oxydant connu pour induire spécifiquement des 8-OdG, afin de

contrôler la survenue des dommages oxydatifs. De fait, nous avons exposé des souris, déficientes ou non pour OGG1, au KBrO3 à trois périodes clés : 1/ en vie fœtale, de 10,5 à 14,5 jours post-conception ; 2/ en vie néonatale, de 0,5 à 4,5 jour post-partum (jpp) ; 3/ à titre de comparaison, à l'âge adulte, de 90 à 94 jpp, une fois que la spermatogenèse avait déjà commencé. Nous montrons dans cette étude, pour la première fois, que les cellules germinales mâles sont très sensibles aux dommages oxydatifs de l'ADN, particulièrement en vie néonatale. En effet, nous observons une altération permanente de la spermatogenèse, comprenant une diminution du poids des testicules, un nombre réduit de cellules souches spermatogoniales, une mortalité germinale accrue et diverses altérations au cours de la prophase I de méiose, aboutissant finalement une nette diminution de la fertilité globale de ces souris.

En outre, nous avons montré que la formation de la 8-OdG dans les cellules germinales néonatales entraînait une instabilité génomique et l'introduction des mutations *de novo* dans la lignée germinale. Celles-ci sont transmises à la génération suivante et ont provoqué, de manière récurrente, l'apparition de malformations faciales dans la descendance.

Enfin, nous avons entamé la collecte du matériel cellulaire nécessaire afin d'étudier les dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques (méthylation et oxydation de l'ADN) survenant dès la fin de la formation des dommages oxydatifs, dans l'optique de décrypter, par ces multiples analyses omiques, les mécanismes sous-jacents aux défauts observés (travaux en cours).

Oxidative DNA damage produced during neonatal life permanently impairs gametogenesis in mice and leads to point mutations transmissible to the offspring.

Jampy, Amandine^{1,3}; Moison, Delphine^{1,3}; Granotier, Christine^{2,3}; Messiaen, Sébastien^{1,3}; Nicolas, Nour^{1,3}; Abdallah, Sonia^{1,3}; Tual, Nolan^{1,3}; Livera, Gabriel^{1,3}; Rouiller-Fabre, Virginie^{1,3}; Guerquin, Marie-Justine^{1,3}†.

Affiliations

¹ Université Paris Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Laboratoire de Développement des Gonades/iRCM/IBFJ, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France;

² Université Paris Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Laboratoire de Radiopathologie/iRCM/IBFJ, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France;

³ Université Paris-Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.

† correspondence: marie-justine.guerquin@cea.fr

Keywords: DNA oxidation, spermatogenesis, spermatogonial stem cell, meiosis, *de novo* mutation.

Abstract

Cells are under continuous exposure to numerous pro-oxidant stressors that damage DNA. Deoxyguanosine is particularly prone to oxidation and 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8OdG) is a major product of genomic DNA oxidation. Beyond the mutagenicity potential, 8-OdG and its repair, initiated by 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1), may have direct and indirect epigenetic repercussions on transcription. Mammalian germ cell differentiation relies on the establishment of a precisely orchestrated transcriptional program allowing the production of mature and functional gametes. We aim to characterize the impact of oxidative DNA damage such as 8OdG during fetal and neonatal life on murine germ cell differentiation. Oxidative DNA lesion was induced by exposure to potassium bromate (KBrO₃) during fetal life (from 10.5 to 14.5 days post-coitum) or neonatal life (from 0.5 to 4.5 days post-partum) in a context of OGG1 deficiency to bypass 8-OdG repair. Here, we show that shortly after birth, germ cells were particularly sensitive to 8OdG in comparison to fetal and adult germ cells and the formation of oxidative DNA damage during this period permanently impairs SSC pool as well as meiotic recombination at adulthood. Moreover, the formation of 8OdG during neonatal life induces the formation of *de novo* mutations in the germline that were transmitted to the next generation and responsible for facial malformations in the offspring. This work confirms the existence of a period of particular sensitivity to environmental pollutants, probably due to the major epigenetic changes occurring in the germ cell at this time.

Introduction

For almost 30 years, environmental pollutants have seriously affected male reproductive capacity. Thirty percent of male infertility cases are still considered idiopathic (Fainberg and Kashanian, 2019) and could be attributable to exogenous environmental factors as medications, pollutants, and lifestyle. Reproductive toxicants can modulate male steroidogenesis potentially affecting genitalia development and sexual behavior but most of them affect male germ line leading to low semen quality & count and/or testicular cancers (Faja et al., 2022; Li and Spade, 2021; Manfo et al., 2014). The early fetal and neonatal period of life are particularly critical for germ cell development. For this reason, infertility and testis cancer have been proposed to have a fetal and neonatal origin (Bonde et al., 2016). We and others have experimentally demonstrated that exposure to several environmental components as bisphenols, phthalates and ionizing radiations during fetal and neonatal life could delay fetal germ cell differentiation, induce germ cell loss, impair the establishment of spermatogonial stem cell pool and influence homologous recombination during meiosis (Abdallah et al., 2023; Eladak et al., 2018; Forand et al., 2009; Muczynski et al., 2012; Vrooman et al., 2015; Wang et al., 2022; Xie et al., 2016). The particular sensitivity of male germ cells to environmental pollutants during fetal and neonatal period could be related to the major germ cell differentiation events that take place at this time. They prepare germ cell for meiosis and allow the establishment of stem cell pool ensuring male fertility. In mice, primordial germ cells (PGCs) that emerge from the proximal epiblast around embryonic 6.5 days post-conception (dpc) migrate to reach the developing gonad at 10.5 dpc. Between 11.5-13.5 dpc in mice, PGCs undergo a global change in gene expression with switch off pluripotency program and up-regulation of genes linked to sexual differentiation and gametogenesis. This transcriptional switch depends on global epigenetic reprogramming and illustrate the first step of germ cell differentiation referred to germ cell licensing (Hu et al., 2015; Spiller and Bowles, 2019). We and others demonstrated that this step is mandatory for germ cell commitment and proper completion of meiosis at adulthood (Abdallah et al., 2023; DiTroia et al., 2019; Nicholls et al., 2019). During this period, Sertoli cells enclose germ cells called pro-spermatogonia to form testis cords. According to this somatic testicular environment, germ cells gradually slow down their proliferation to produce G0/G1 arrested germ cells, in which DNA methylation patterns are reestablished. Around birth, two populations of fetal prospermatogonia take different fates delineated by their *Id4* expression: one directly transitions into differentiated spermatogonia and engages in the first wave of meiosis which occurs at around 8-10 days post-partum (dpp), while the other produces the foundational spermatogonial stem cells (SSC) (Dura et al., 2022; Liao et al., 2019). In SSC, reversible cell cycle arrest and long-term maintenance of their quiescent status are necessary for continuous spermatogenesis throughout reproductive lifespan (Wang et al., 2023). Alteration during juvenile expansion of SSC and early, uncontrolled differentiation of adult SSC induces premature depletion of the stem cell pool and are related to disruption during

meiotic homologous recombination, resulting in decreased gamete production (Dura et al., 2022; Ribeiro and Crossan, 2023).

The underlying mechanisms of long-term perturbation of spermatogenesis after perinatal exposure to pollutants are unclear and are mostly related to estrogenic modulation (Vrooman et al., 2015; Xie et al., 2016). However, numerous data observe differential epigenetic modulation after perinatal exposure to pollutants and suggest a link between these modifications and perturbations in spermatogenesis (Ho et al., 2012; Prados et al., 2015; Tando et al., 2021). The majority of environmental pollutants share a pro-oxidant action, *i.e.* they are capable of inducing an increase in reactive oxygen species in cells (Mathur and D’Cruz, 2011) and could lead to oxidative DNA lesions. Guanine is the most sensitive nucleotide to oxidation, leading to the formation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8OdG). The presence of 8OdG have mutagenic potential causing G>T (C>A) transversions but also have epigenetic repercussion by activating the recruitment of the transcriptional machinery (Gorini et al., 2021) or by affecting the chromatin environment near gene promoter and regulator sites dependently or not to DNA methylation (Fleming et al., 2017; Giorgio et al., 2020; Maltseva et al., 2009; Singh et al., 2011). Thus, the aim of this study was to explore the impact of 8OdG oxidative DNA damage on two sensitive stages of germ cell differentiation (fetal and neonatal life), to study the long-term effects on fertility and to compare that to a same exposure in adult life. To do so, we combined a genetic model (mice invalidated for *Ogg1*) with exposure to a pro-oxidant agent (KBrO₃) specifically known to induce 8OdG (Ballmaier and Epe, 1995; Kawanishi and Murata, 2006). We show for the first time that male germ cells are highly sensitive to oxidative DNA damage, and that they present a specific window of sensitivity during which a major occurrence of 8OdG leads to permanent impairment of spermatogenesis and fertility in mice. Moreover, we showed that 8OdG formation in neonatal germ cells leads to genomic instability and *de novo* mutations in the germline that are transmitted to the next generation.

Methods

Animals

The mice used in this study were *Ogg1* mutant C57/Bl6 mice obtained from the production colony at our laboratory (Klungland et al., 1999). All mice care protocols and experiments were reviewed and approved by the ethics committee of CETEA – CEA DSV (France) and followed the guideline for the care and use of laboratory animals of the French Ministry of Agriculture. Mice were hosted in polypropylene cages on controlled conditions namely a 12h light/12h dark cycle, a temperature around 21°C and water and food *ad libitum*. For fetal embryo collection, the presence of vaginal plug was determined after one night of common housing of two-to-four-month-old males and females. The following morning was considered as 0.5-day post-coitum (dpc). Postnatal ages were counted considering the day of the birth as 0.5-day post-partum (dpp). All mice were euthanized by cervical dislocation. For fetal and postnatal pups, the gonad isolation was performed under a binocular microscope.

Study design

Potassium bromate (KBrO₃, CAS number 7758-01-2, Merck n° 104912) was administrated by drinking water (adult/pregnant mice) or by assisted oral delivery (neonatal pups) considering the daily intake of KBrO₃ to 100 mg/kg/day. Pregnant mice were exposed from 10.5 to 14.5 dpc and 3-month-old male mice were exposed during 4 days (3.5mM of KBrO₃ in drinking water). Neonatal pups were pipette-fed from 0.5 to 4.5 dpp by thickening water with 1% gum tragacanth before KBrO₃ dilution. Control pups were fed with 1% gum tragacanth mixture. Pups were weighed before feeding to ensure that they received the right dose of KBrO₃.

Fertility assay

2-month-old OGG1 (WT or KO) male mice unexposed or exposed to KBrO₃ during neonatal life were mated with same age C57Bl6 female until twelve litters were obtained. Births were monitored every day and pups were counted and then sacrificed.

Testis dissection and epididymal sperm collection.

Adult testes were collected and for each mouse, one of the testes was fixed 24 hours in 4% paraformaldehyde or in bouin fluid as needed. The other was used to make chromosome spreads or metaphase spreads of spermatocytes (*cf.* the following sections). In the same mice, body and tail of the epididymis and the vas deferens were collected and placed in 1 mL of M16 media (Merck) and then lacerated in the media to allow sperm release. After 5 minutes wait, the media with released spermatozoa were collected and a part is used to count the number of spermatozoa using a Malassez. Fetal and neonatal testis were fixed only 4 hours at 4°C in 4% paraformaldehyde.

Chromosomes spreads

Chromosome spreads of spermatocytes were performed using established methods with modifications (Petrillo et al., 2020). Briefly, testes were dissociated with Collagenase solution (2mg/mL of Collagenase type I, Gibco, diluted in Testis Isolation Medium pH 7.3) during 55 minutes at 32°C followed by rinsing and a 15 minutes incubation with a Trypsine/DNase I solution at 32°C (0.7mg/mL of Trypsine type I, Merck, and 4µg/mL of DNase I, Merck, diluted in Testis Isolation Medium pH 7.3). After further rinsing, spermatocytes were homogenized with 0.1M sucrose and then surface-spread on glass slides previously covered with 1% PFA containing 1% Triton X-100. After 1h30 in a humid chamber, slides were air-dried and washed in H₂O containing 0,4% wetting active agent (WAC). Finally, slides were soft-dried and stocked at -80°C until immunostaining.

Metaphases spreads

Metaphases spreads were performed using established methods (Evans et al., 1964). Briefly, seminiferous tubules were lacerated with forceps in 2.2% isotonic sodium citrate solution and centrifuged 5 minutes at 200 G before cell suspension in 1 % sodium citrate solution (Merck). After 15 minutes incubation, testicular cells were centrifuged and resuspended in methanol/acetic acid/chloroforme fixative solution (73.2% methanol, 24.3% glacial acetic acid, 2.5% chloroforme). Testicular cells were surface filed on cold wet glass slides and soft-dried 24h before stocking at -20°C. After rehydration in PBS, slides were incubating with 1/10.000 DAPI in PBS, rinsed with PBS and mount with ProLong Gold (Invitrogen).

Histology and immunostaining

All samples were embedded in Paraffin and cut into 5µm sections. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or processed for immunofluorescence (IF) or immunochemistry (IHC). For IHC analyses, tissue sections were subjected to heat-induced antigen retrieval (Tris Buffer, pH9) followed by H₂O₂ treatment (1%, endogenous peroxidase blockage) for 10 minutes. Unspecific staining was blocked using 2.5% horse serum blocking solution (ImmPress kit) for 30 minutes and incubated overnight at room temperature with monoclonal mouse anti-PLZF (sc28319, Santa Cruz, 1:200) in an humidified chamber. Slides were incubated 30 minutes with the appropriate secondary antibody HRP-conjugated (ImmPress kit), visualized with DAB peroxidase substrate and counterstained with Hematoxylin. Between all steps, sections were washed in PBS.

For IF analyses, tissue sections were subjected to heat-induced antigen retrieval (Citrate, pH6) while chromosome spreads and testicular spreads were rehydrated in PBS. Then, all slides were blocked for 1 hour at room temperature with PBS added 0.2% BSA, 0.2% cold water fish skin gelatin and 0.05% Tween-20 and then incubated overnight with the primary antibody in humid chamber at room temperature. The primary antibodies used in this study were as follows: polyclonal goat anti-SCP3

(AF3750, Biotechne, 1:100), polyclonal rabbit anti-SCP1 (ab15090, Abcam, 1:500), monoclonal mouse anti-H2A.X (Ser139, clone JBW301)(05-636-I, Merck, 1:500), monoclonal mouse anti-MLH1 (IHC409, GeneAb, 1:50), polyclonal rabbit anti-SCP3 (NB300-232, Novus, 1:500), monoclonal rat anti-GCNA1 (TRA98, ab82527, Abcam, 1:200), monoclonal mouse-anti DDX4 (ab27591, Abcam, 1:500). After 3 washes with PBS, slides were incubated 1 hour at 37°C with appropriate Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch), rinsed again 3 times in PBS, incubated with DAPI (1/10.000 in PBS) and mounted with ProLong Gold (Invitrogen). TUNEL staining was performed using In Situ Cell death Detection kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations.

Sequencing, Assembly, and Variant Calling

Whole genome sequencing was performed on tail biopsies from neonatal and adult OGG1 KO, OGG1 WT and pure C57Bl/6j mice as presented in Figure 4A. DNA extraction, whole genome sequencing, alignment, variant calling and all quality controls were performed by Novogene Compagny. A total amount of 0.2 µg DNA per sample was used as input material for the DNA library preparations. Sequencing library was generated using NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, USA!Catalog #: E7370L) following manufacturer's recommendations and index codes were added to each sample. Briefly, genomic DNA sample was fragmented by sonication to a size of 350 bp. Then DNA fragments were endpolished, A-tailed, and ligated with the full-length adapter for Illumina sequencing, followed by further PCR amplification. After PCR products were purified by AMPure XP system (Beverly, USA). Subsequently, library quality was assessed on the Agilent 5400 system (Agilent, USA) and quantified by QPCR (1.5 nM). The qualified libraries were pooled and sequenced on Illumina platforms with PE150 strategy, according to effective library concentration and data amount required. Raw FASTQ files were trimmed if either one read of paired reads contains adapter contamination, if more than 10% of bases in paired reads are uncertain or if the proportion of low quality (Phred quality <5) bases is over 50% in either one read of paired reads. Trimmed FASTQ files were aligned to the hg38 genome using BWA (version 0.7.8-r455, mem -t 4 -k 32 -M parameters), sorted and were dislodged duplication by SAMtools (version 1.3.1, parameter: rmdup) and Picard (version 1.111, parameter: VALIDATION_STRINGENCY=SILENT). The raw SNP/InDel sets are called by SAMtools with the parameters as '-C 50 -mpileup -m2 -F 0.002 -d 1000'. Then we filtered this sets using the following criteria: (1) The depth of the variate position >4 and (2) The mapping quality >20. ANNOVAR (2015Dec14) was used for annotation of the detected variations.

Bioinformatical SNP analyses, strain and ATACseq comparison

All bioinformatics analyses were performed using R software (version 4.2.2). As presented in Supplementary Figure 1A-B, we first trimmed SNPs from C57Bl/6j by comparison with variants sequenced in a pure C57BL/6 female mouse. Then, we subtracted common SNPs observed in all OGG1

mice to reveal putative *de novo*/original mutations. All further analyses were performed on trimmed data. Before and after SNP trim, we did not observe major modification of the distribution of types of transitions and transversions (Supplementary Figure 1C). We used a custom R script to correlate SNPs position with ATACseq data from *ID4-eGFP^{Bright}* or *ID4-eGFP^{Dim}* positive cells from 6 dpp testes (Cheng et al., 2020). First, we conserved only G<>T and A<>C mutations (putative mutations observed after 8OdG lesions, transversion_ox). All transversions_ox retrieved at 1 Kb before and after start and end of ATACseq reads were filtered to evidence specific enrichment of transversions_ox in offsprings.

Statistical analyses

All data are presented as the means \pm s.e.m.s. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (www.graphpad.com). The significance of difference was assessed by the two-way ANOVA followed by Tukey test and statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Neonatal oxidative DNA damage impairs global fertility in mice

To demonstrate that fetal and neonatal germ cells are highly sensitive to DNA oxidative lesions, particularly 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8OdG), we exposed OGG1-deficient mice to potassium bromate (KBrO₃) from 10.5 days post conception (dpc) to 14.5 dpc or from 0.5 days post-partum (dpp) to 4.5 dpp. As a comparison, we also exposed OGG1 mice in adulthood, once spermatogenesis has already begun (from 90 dpp to 94 dpp – Figure 1A). In the absence of OGG1, the main glycosylase that repair 8OdG, we observed an increase in the formation of 8OdG in germ cells along spermatogenesis. However oxidative lesions were formed at low levels notably in fetal germ cells (a 1.2- to 2-fold increase of 8OdG total surface area per cell in OGG1 KO compared to WT) and in a stochastic and unequal manner (only 5 to 26 % of cells with an 8OdG total surface per cell greater than WT mean +2 SD, Supplementary Figure 2A). KBrO₃ treatment should trigger and enhance the production of 8OdG notably in a context of OGG1 deficiency as observed in neonatal germ cells at the end of neonatal exposure (Supplementary Figure 2B).

Three months after KBrO₃ exposure, we collected testes and epididymal sperm to evaluate long-term effects of 8OdG generation during fetal and neonatal life on spermatogenesis and male fertility. Neonatal as well as adult KBrO₃ exposure in OGG1-deficient mice led to a significant decrease of testis weight compared to the other conditions (Figure 1B) but no significant reduction of sperm count was observed in all conditions notably due to high variation between individuals. However, we observed that sperm count was significantly globally influenced by KBrO₃ treatment or OGG1 deficiency (2-way analysis of variance: treatment and genotype factors, Figure 1C).

As OGG1-deficient mice treated neonatally to KBrO₃ appears to be more affected than other mice, we scored their reproductive ability. We observed a decrease of the number of pups produced by OGG1 WT or KO mice treated neonatally to KBrO₃ (Figure 1D).

Neonatal oxidative damage induces spermatogonial stem cell loss in adult testis.

To understand the origin of testis weight reduction observed after neonatal exposure to KBrO₃ in OGG1-deficient mice, we investigated testicular morphology by histological analyses. We considered several types of abnormalities as a lack of lumen in seminiferous tubules, presence of numerous pyknotic cells in tubules and the occurrence of Sertoli Cells Only (SCO – Figure 2A). Quantitative evaluation of the abnormal testicular tubules showed an increase of the ratio of abnormal tubules in OGG1-deficient mice, independently of KBrO₃ treatment. However, neonatal exposure to KBrO₃ exacerbated significantly the presence of abnormal tubules in OGG1-deficient mice. As most of these abnormal tubules were partially or totally devoid of germ cell (more than 40 % of abnormal tubules, data not shown), we hypothesized that 8OdG formation during neonatal life had an impact on the

establishment of spermatogonial stem cells pool. To confirm this observation, we carried out immunodetection of PLZF in adult testes (Figure 2B). We observed a significant reduction of PLZF-positive cell density in seminiferous tubules from mice neonatally but also *in utero* treated to KBrO₃ independently of OGG1 deficiency. Interestingly, no change in PLZF-positive cell density was observed in KBrO₃-treated adult mice. Since the number of adult SSC depends on the initial number of germ cell precursors (*i.e.* fetal and neonatal germ cells), we assessed the short-term impact of OGG1 deficiency and/or KBrO₃ exposure on fetal and neonatal germ cells at the end of KBrO₃ exposure at 14.5 dpc and 4.5 dpp respectively (Figure 2C-D). OGG1 deficiency seems to reduce germ cell density during fetal life, independently of KBrO₃ treatment. However, this germ cell reduction was not noted after birth. In addition, fetal or neonatal exposure to KBrO₃ did not amplify the decrease in germ cell density at the end of exposure, meaning that the reduction in PLZF-positive cell observed in adulthood is not the result of germ cell precursors loss during fetal and neonatal life.

Neonatal oxidative damage impairs meiosis in adult testis.

In addition to spermatogonial stem cell loss, we observed an increase in seminiferous tubules containing TUNEL-positive germ cells in OGG1-deficient mice treated with KBrO₃ during fetal or neonatal life. No increase of TUNEL-positive germ cells was observed after adult exposure to KBrO₃ (OGG1 WT and KO mice). Most of them were SYCP3-positive cells and showed meiotic metaphase features suggesting cell death during meiosis (Figure 3A-B). To evaluate specific impairment during meiotic prophase I, germ cell loss during prophase I was evaluated (Figure 3C). We observed a significant decrease in the proportion of pachytene cells (compared with leptotene cells) in testes from OGG1-deficient mice treated with KBrO₃ during neonatal life and adulthood. This suggests that the transition from leptotene to pachytene spermatocytes was impaired, which may have been caused by defects in chromosome recombination and/or synapsis. Although double-strand breaks (DSB) formation is normal and there is no impairment of synapsis, defects in DSB repair appeared in pachynema of OGG1 WT and KO KBrO₃-treated mice during fetal and neonatal life. Early DSB repair events were monitored by examining the localization of the RecA strand exchange protein, RAD51, on chromosome cores of the autosomes at leptotene and zygotene stages. No significant increase in RAD51 foci was observed in spermatocytes from OGG1-deficient KBrO₃-treated mice (Supplementary Figure 3). In addition, SYCP1-SYCP3 co-labeling in spermatocytes did not show apparent asynapsis of autosome bivalents in these cells. However, analysis of H2AX phosphorylation at mid-late pachytene stage (using SYCP3 staining) revealed abnormal persistence of γ H2AX foci in spermatocytes from OGG1 WT and KO KBrO₃-treated mice during fetal and neonatal life, despite a normal signal in leptotene and zygotene stages. The proportion of spermatocytes at the pachytene stage exhibiting γ H2AX foci was significantly higher in OGG1-deficient mice (Figure 3D). In these cells, we observed different patterns

of γ H2AX staining with small foci associated with autosomal bivalents and foci between autosomal bivalents and the sex body.

Analysis of the chromosomal distribution of the mismatch repair protein MLH1, a marker of crossover formation, revealed a strong decrease in the number of MLH1 foci per spermatocyte in OGG1-deficient exposed to KBrO3 neonatally (Figure 3E) without any modification in the MLH1 distribution along synapsis under all condition (data not shown). Consequently, we observed a slight increase in chromosomal univalent during metaphase I in spermatocytes treated neonatally to KBrO3 (independently of the OGG1 deficiency – Figure 3F). In summary, the presence of oxidative DNA damage formed in neonatal spermatogonia results in germline death during prophase I several months after their formation, probably due to an alteration in DSB repair, and may lead to the formation of aneuploid gametes.

Germline mutations induced by neonatal oxidative damage are transmitted to offspring, leading to facial malformations.

In addition to the reduction in the number of pups produced by OGG1 WT or KO mice treated neonatally with KBrO3, we observed the occurrence of facial malformations in offspring from mating between a male exposed neonatally to KBrO3 and an unexposed C57Bl6/J female (independently of OGG1 deficiency – Figure 4B). Various visible malformations were noted in 3-4% of pups (female only): total lack of eyes (anophthalmia), reduced eye size (microphthalmia) or severe facial malformations (Figure 4A-B). It is well-known that 8OdG is highly mutagenic due to its propensity to pair with adenine in a *syn* conformation, causing a guanine-to-thymine mutation G>T (C>A) during replication. Moreover, polymerase-induced mutations A>C (T>G) in the presence of 8-oxo-dGTP have also been observed. For this reason, we wanted to characterize the incidence of single nucleotide variants (SNVs) and particularly G<>T and C<>A transversions (transversion_ox) by whole genome sequencing (WGS) in the offspring of KBrO3-treated father (Figure 4). Analysis of SNPs from 4 pups (3 with facial malformations and 1 with no apparent malformation) and comparison with SNVs from 2 KBrO3-neonatally exposed fathers, 1 untreated OGG1 WT female and 1 untreated pure C57BL/6j untreated mother as presented in Supplementary Figure 1C and Figure 4A, showed a slight increase in G<>T and C<>A transversions (Figure 4C and Supplementary Figure 1C). As 8OdG accumulates preferentially in euchromatin (open chromatin), we aimed to verify a specific enrichment of G<>T and C<>A transversions in chromatin regions known to be specifically nucleosome-depleted in neonatal spermatogonia (at the time of KBrO3 exposure). To do this, we used published ATACseq data from *ID4-eGFP^{Bright}* or *ID4-eGFP^{Dim}* positive cells from neonatal testes (6dpp) and correlated the position of open chromatin regions with the presence of identified ox-transversions in the offspring (Supplementary Figure 4). Unfortunately, we did not identify any correlation between the position of all SNVs and open chromatin regions (OCR)

in neonatal spermatogonia, but we did observe a slight enrichment of SNVs in these OCRs in pups compared with fathers (11.2 % of transversion_ox were located in OCRs in fathers versus 12.8 % in offspring), which seems to be amplified in a context of OGG1 deficiency (Family 2 and 3 in Supplementary Figure 4A). This enrichment was preferentially located in chromosomes 2, 6, 12, 15, 19 and X, but we were also able to punctually observe the presence of transversion_ox in the OCR in other chromosomes as presented in Supplementary Figure 4C.

Discussion

Fetal or neonatal exposure to environmental pollutants, notably endocrine-disrupting compounds, is known to be particularly harmful to germ cells and fertility at adulthood. As numerous pollutants share pro-oxidant activity and induce the production of reactive oxygen species (ROS) in cells, previous studies suggest the involvement of ROS in these germ cell defects (Abdallah et al., 2023; Tando et al., 2021). Among oxidative cell damage, 8OdG is more prone to induce epimutation and DNA mutation that could impair the establishment of spermatogonial stem cells (SSC), meiosis and could be transmissible to the next generation. Firstly, due to its propensity to pair with adenine, causing G>T mutation after replication (but also C>A mutation), 8OdG or 8-oxo-dGTP induce inheritable *de novo* mutations and also interfere with DNA replication, causing genomic instability and strand breaks that promote cell death or tumorigenesis (Çağlayan et al., 2017; Hahm et al., 2022). In addition, 8OdG modification acts as an epigenetic marker and modulates DNA and histone methylation depending or not on OGG1 activity (Hahm et al., 2022). Given the global transcriptional and epigenetic changes that occur in germ cells during fetal and neonatal life preparing SSC formation/differentiation and meiosis, we postulate that 8OdG formation during these crucial steps could impair spermatogenesis, as observed after EDC or ionizing radiation exposures.

In the present study, we examined the effect of 8OdG formation during germ cell licensing in fetal life and SSC formation after birth on adult spermatogenesis. Here, we show that shortly after birth, germ cells were particularly sensitive to 8OdG in comparison with fetal and adult germ cells, and that the formation of oxidative DNA damage during this period permanently impairs not only the pool of SSC but also meiosis in adulthood. In addition to the alteration of spermatogenesis leading to decreased male fertility, 8OdG formation during neonatal life induces germline mutation that can be transmitted to the offspring.

The formation of 8OdG during fetal and neonatal life permanently alters the SSC pool in the adult testis. An imbalance in SSC homeostasis, apoptosis of spermatogonia after exit from SSC quiescence but also impairment during the establishment and expansion of the SSC pool could explained this decrease of SSC. The fact that the formation of oxidative damage in adulthood did not impair the SSC pool supports the hypothesis of epigenetic interference of 8OdG in germ cells during perinatal life. Genome-wide remethylation occurs during the quiescent phase in pro-spermatogonia and will be modulated locally in SSC to program their ability to self-renew or differentiate. Partial to complete germ cell depletion has been observed in mice in the absence of either of the two *de novo* methyltransferases DNMT3 A, C or its cofactor DNMT3L (Dura et al., 2022; Liao et al., 2014). Interestingly, 8OdG located near CpG islands modulate DNMT binding and interact with TET enzyme *via* OGG1 (Hahm et al., 2022). For this reason, 8OdG could interfere with the dynamic of DNA methylation explaining the adverse effect on SSC. However, precise mapping of 5mC and 5hmC in

neonatal SSC will be required to clarify the epigenetic consequences of 8OdG, notably in the absence of OGG1. In addition to the interplay between 8OdG and DNA methylation, we did not exclude that the presence of numerous unrepaired 8OdG could induce impaired S-phase progression during neonatal SSC expansion. As we observed increased cell death in adult spermatogonia after fetal and neonatal exposure to KBrO₃ in the context of OGG1 deficiency, we also consider that presence of unrepaired 8OdG and subsequent post-replicative strand breaks could induce apoptosis in spermatogonia after their exit from quiescence. The fact that adult cell death was only observed in OGG1-deficient mice suggests the ability of GC to repair 8OdG during quiescent phase. Interestingly, recent study show that quiescent Foxc2-positive SSC express numerous DNA repair enzyme, including OGG1 (Wang et al., 2023).

In this study, we evidenced that 8OdG formation in fetal, neonatal or adult GCs causes multiple alterations during the repair of meiotic double-strand breaks. In the context of OGG1 deficiency, the most severe meiotic defects revealed by the persistence of H2AX in pachynema could activate pachytene checkpoint leading to spermatocyte loss during the pachytene stage. Curiously, we found no evidence of apoptosis during meiosis in the testes treated to KBrO₃ in adulthood, despite a significant decrease of pachynema. We hypothesized that meiotic cells loss induced by 8OdG formation in adult GCs is not a permanent process and could be explained by transient DNA damage in pre-meiotic spermatogonia and spermatocytes. Homologous recombination during meiosis is a highly controlled process that enables chromosome segregation. Meiotic double-strand breaks, chromatin landscape and inhibition of toxic retrotransposon reactivation are strongly controlled by DNA methylation and histone post-translational modifications (Wang et al., 2023; Yuan et al., 2022). A previous study observed that meiotic recombination hot-spots are preferentially located within regions of high 8dG density in humans, and suggested that meiotic recombination is induced by 8OdG (Ohno et al., 2006). In our study, we did not observe any significant increase in RAD51 after 8OdG formation in fetal and neonatal GCs. In addition, we did not observed an increase in the number of crossovers or a disruption in crossovers distribution. These observations suggest that 8OdG enrichment in fetal and neonatal GC did not modify the number and localization of meiotic double-strand breaks induced by SPO11. We might consider that permanent impairment of meiotic recombination could be explained by retrotransposon reactivation as observed in DNMT3L- and DNMT3C-deficient mice (Bourc'his and Bestor, 2004; Jain et al., 2017; Webster et al., 2005; Zamudio et al., 2015).

Interestingly, an increased incidence of facial malformations was observed in the offspring of KBrO₃-treated fathers during the neonatal period. This indicates that unrepaired 8OdG in neonatal spermatogonia lead to heritable *de novo* DNA mutations in the next generation. The enrichment of G<>T and C<>A SNVs in offspring sustains this hypothesis. *De novo* DNA mutations, whether SNVs,

indels or other mutations, could induce developmental disorders and explain facial malformations observed at birth. For this reason, altered fertility in KBrO₃-treated mice in the neonatal period appears to be a consequence of SSC loss and meiotic defects, but also of putative embryonic death due to *de novo* mutations.

The mutational landscape is molded by the interaction between the ROS source, DNA repair, and the local status of chromatin. Lamina-associated chromatin and open chromatin regions are known to be more sensitive to ROS due to chromatin's proximity to the main source of ROS (*i.e.* mitochondria) and/or GC content and chromatin accessibility (Ohno et al., 2006; Poetsch et al., 2018; Yoshihara et al., 2017). Consequently, open chromatin regions (OCR) in neonatal spermatogonia are more prone to DNA oxidation. In this study, correlation between OCRs in spermatogonia and SNV position in offspring shows a slight enrichment of SNVs in OCR suggesting DNA oxidation in these regions in neonatal spermatogonia. To confirm this observation, it will be important to carry out a precise mapping of DNA oxidation at this stage and evaluate the consequences in terms of DNA mutation and transcription.

To conclude, although the impact of environmental pollutants on fertility is well established, the mechanisms of toxicity remain poorly understood. In this study, we demonstrate, for the first time, the high sensitivity of germ cells to oxidative DNA damage, particularly during the neonatal period, where a major occurrence of 8OdG permanently impairs spermatogenesis through germ cell loss, depletion of SSC pool and various meiotic alterations. Overall, this results in a significant reduction in mouse fertility. As most environmental pollutants share a pro-oxidant activity, we propose that at least a part of their deleterious effects is mediated by oxidative DNA damage. Finally yet importantly, the occurrence of 8OdG triggers genomic instability and the formation of *de novo* mutations in the germline, which can be transmissible to the next generation and are responsible for developmental alterations.

Acknowledgments

We warmly thank members of the Laboratory of the Development of the Gonads for discussions and technical support. We are grateful to A. Campalans, D. Volle for discussion and suggestions. We thank S. Vincent-Naulleau, V. Barroca, S. Devanand, C. Duwat and V. Neuville, the team of the animal housing and experimentation facilities at iRCM. We also thank L. Irbah, from the microscopy platform, for its help. We finally thank A. Gouret, A. Leliard and A. Le Cloirec for her skillful secretarial assistance. This research was supported by Université Paris Cité and INSERM. A.J. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

Declaration of Interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Abdallah, S., Jampy, A., Moison, D., Wieckowski, M., Messiaen, S., Martini, E., Campalans, A., Radicella, J.P., Rouiller-Fabre, V., Livera, G., Guerquin, M.-J., 2023. Foetal exposure to the bisphenols BADGE and BPAF impairs meiosis through DNA oxidation in mouse ovaries. *Environ Pollut* 317, 120791. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120791>
- Ballmaier, D., Epe, B., 1995. Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16, 335–342. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.2.335>
- Bonde, J.P., Flachs, E.M., Rimborg, S., Glazer, C.H., Giwercman, A., Ramlau-Hansen, C.H., Hougaard, K.S., Høyer, B.B., Hærving, K.K., Petersen, S.B., Rylander, L., Specht, I.O., Toft, G., Bräuner, E.V., 2016. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 23, 104–125. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw036>
- Bourc'his, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature02886>
- Çağlayan, M., Horton, J.K., Dai, D.-P., Stefanick, D.F., Wilson, S.H., 2017. Oxidized nucleotide insertion by pol β confounds ligation during base excision repair. *Nat Commun* 8, 14045. <https://doi.org/10.1038/ncomms14045>
- Cheng, K., Chen, I.-C., Cheng, C.-H.E., Mutoji, K., Hale, B.J., Hermann, B.P., Geyer, C.B., Oatley, J.M., McCarrey, J.R., 2020. Unique Epigenetic Programming Distinguishes Regenerative Spermatogonial Stem Cells in the Developing Mouse Testis. *iScience* 23, 101596. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101596>
- DiTroia, S.P., Percharde, M., Guerquin, M.-J., Wall, E., Collignon, E., Ebata, K.T., Mesh, K., Mahesula, S., Agathocleous, M., Laird, D.J., Livera, G., Ramalho-Santos, M., 2019. Maternal vitamin C regulates reprogramming of DNA methylation and germline development. *Nature* 573, 271–275. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1536-1>

- Dura, M., Teissandier, A., Armand, M., Barau, J., Lapoujade, C., Fouchet, P., Bonneville, L., Schulz, M., Weber, M., Baudrin, L.G., Lameiras, S., Bourc'his, D., 2022. DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis. *Nat Genet* 54, 469–480. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01040-z>
- Eladak, S., Moison, D., Guerquin, M.-J., Matilionyte, G., Kilcoyne, K., N'Tumba-Byn, T., Messiaen, S., Deceuninck, Y., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Antignac, J.-P., Mitchell, R., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2018. Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS One* 13, e0191934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191934>
- Evans, E.P., Breckon, G., Ford, C.E., 1964. AN AIR-DRYING METHOD FOR MEIOTIC PREPARATIONS FROM MAMMALIAN TESTES. *Cytogenetics* 3, 289–294. <https://doi.org/10.1159/000129818>
- Fainberg, J., Kashanian, J.A., 2019. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res* 8, F1000 Faculty Rev-670. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Faja, F., Esteves, S., Pallotti, F., Cicolani, G., Di Chiano, S., Delli Paoli, E., Lenzi, A., Lombardo, F., Paoli, D., 2022. Environmental disruptors and testicular cancer. *Endocrine* 78, 429–435. <https://doi.org/10.1007/s12020-022-03171-z>
- Fleming, A.M., Zhu, J., Ding, Y., Burrows, C.J., 2017. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in the Context of a Gene Promoter G-Quadruplex Is an On-Off Switch for Transcription. *ACS Chem Biol* 12, 2417–2426. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00636>
- Forand, A., Messiaen, S., Habert, R., Bernardino-Sgherri, J., 2009. Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction* 137, 487–495. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0358>
- Giorgio, M., Dellino, G.I., Gambino, V., Roda, N., Pelicci, P.G., 2020. On the epigenetic role of guanosine oxidation. *Redox Biol* 29, 101398. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101398>
- Gorini, F., Scala, G., Cooke, M.S., Majello, B., Amente, S., 2021. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair (Amst)* 97, 103027. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103027>
- Hahm, J.Y., Park, J., Jang, E.-S., Chi, S.W., 2022. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med* 54, 1626–1642. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00822-z>
- Ho, S.-M., Johnson, A., Tarapore, P., Janakiram, V., Zhang, X., Leung, Y.-K., 2012. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. *ILAR J* 53, 289–305. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.3-4.289>
- Hu, Y.-C., Nicholls, P.K., Soh, Y.Q.S., Daniele, J.R., Junker, J.P., Oudenaarden, A. van, Page, D.C., 2015. Licensing of Primordial Germ Cells for Gametogenesis Depends on Genital Ridge Signaling. *PLOS Genetics* 11, e1005019. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005019>
- Jain, D., Meydan, C., Lange, J., Claeys Bouuaert, C., Lailier, N., Mason, C.E., Anderson, K.V., Keeney, S., 2017. rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. *PLoS Genet* 13, e1006964. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006964>

- Kawanishi, S., Murata, M., 2006. Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology* 221, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.002>
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., Barnes, D.E., 1999. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13300–13305. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13300>
- Li, H., Spade, D.J., 2021. REPRODUCTIVE TOXICOLOGY: Environmental exposures, fetal testis development and function: phthalates and beyond. *Reproduction* 162, F147–F167. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0592>
- Liao, H.-F., Chen, W.S.C., Chen, Y.-H., Kao, T.-H., Tseng, Y.-T., Lee, C.-Y., Chiu, Y.-C., Lee, P.-L., Lin, Q.-J., Ching, Y.-H., Hata, K., Cheng, W.T.K., Tsai, M.-H., Sasaki, H., Ho, H.-N., Wu, S.-C., Huang, Y.-H., Yen, P., Lin, S.-P., 2014. DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells. *Development* 141, 2402–2413. <https://doi.org/10.1242/dev.105130>
- Liao, J., Ng, S.H., Luk, A.C., Suen, H.C., Qian, Y., Lee, A.W.T., Tu, J., Fung, J.C.L., Tang, N.L.S., Feng, B., Chan, W.Y., Fouchet, P., Hobbs, R.M., Lee, T.L., 2019. Revealing cellular and molecular transitions in neonatal germ cell differentiation using single cell RNA sequencing. *Development* 146, dev174953. <https://doi.org/10.1242/dev.174953>
- Maltseva, D.V., Baykov, A.A., Jeltsch, A., Gromova, E.S., 2009. Impact of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine on Methylation of the CpG Site by Dnmt3a. *Biochemistry* 48, 1361–1368. <https://doi.org/10.1021/bi801947f>
- Manfo, F.P.T., Nantia, E.A., Mathur, P.P., 2014. Effect of environmental contaminants on mammalian testis. *Curr Mol Pharmacol* 7, 119–135. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150126155420>
- Mathur, P.P., D’Cruz, S.C., 2011. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J Androl* 13, 585–591. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.40>
- Muczynski, V., Lecureuil, C., Messiaen, S., Guerquin, M.-J., N’tumba-Byn, T., Moison, D., Hodroj, W., Benjelloun, H., Baijer, J., Livera, G., Frydman, R., Benachi, A., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2012. Cellular and molecular effect of MEHP Involving LXR α in human fetal testis and ovary. *PLoS One* 7, e48266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048266>
- Nicholls, P.K., Schorle, H., Naqvi, S., Hu, Y.-C., Fan, Y., Carmell, M.A., Dobrinski, I., Watson, A.L., Carlson, D.F., Fahrenkrug, S.C., Page, D.C., 2019. Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 25677–25687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910733116>
- Ohno, M., Miura, T., Furuichi, M., Tominaga, Y., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., 2006. A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res* 16, 567–575. <https://doi.org/10.1101/gr.4769606>
- Petrillo, C., Barroca, V., Ribeiro, J., Lailier, N., Livera, G., Keeney, S., Martini, E., Jain, D., 2020. shani mutation in mouse affects splicing of Spata22 and leads to impaired meiotic recombination. *Chromosoma* 129, 161–179. <https://doi.org/10.1007/s00412-020-00735-8>
- Poetsch, A.R., Boulton, S.J., Luscombe, N.M., 2018. Genomic landscape of oxidative DNA damage and repair reveals regioselective protection from mutagenesis. *Genome Biol* 19, 215. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1582-2>

- Prados, J., Stenz, L., Somm, E., Stouder, C., Dayer, A., Paoloni-Giacobino, A., 2015. Prenatal Exposure to DEHP Affects Spermatogenesis and Sperm DNA Methylation in a Strain-Dependent Manner. *PLoS One* 10, e0132136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132136>
- Ribeiro, J., Crossan, G.P., 2023. GCNA is a histone binding protein required for spermatogonial stem cell maintenance. *Nucleic Acids Res* 51, 4791–4813. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad168>
- Singh, S.K., Szulik, M.W., Ganguly, M., Khutsishvili, I., Stone, M.P., Marky, L.A., Gold, B., 2011. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Res* 39, 6789–6801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr275>
- Spiller, C., Bowles, J., 2019. Sexually dimorphic germ cell identity in mammals. *Curr Top Dev Biol* 134, 253–288. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.011>
- Tando, Y., Hiura, H., Takehara, A., Ito-Matsuoka, Y., Arima, T., Matsui, Y., 2021. Epi-mutations for spermatogenic defects by maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Elife* 10, e70322. <https://doi.org/10.7554/eLife.70322>
- Vrooman, L.A., Oatley, J.M., Griswold, J.E., Hassold, T.J., Hunt, P.A., 2015. Estrogenic exposure alters the spermatogonial stem cells in the developing testis, permanently reducing crossover levels in the adult. *PLoS Genet* 11, e1004949. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004949>
- Wang, Y., Wu, Y., Zhang, S., 2022. Impact of bisphenol-A on the spliceosome and meiosis of sperm in the testis of adolescent mice. *BMC Vet Res* 18, 278. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03336-y>
- Wang, Z., Jin, C., Li, P., Li, Y., Tang, J., Yu, Z., Jiao, T., Ou, J., Wang, H., Zou, D., Li, M., Mang, X., Liu, J., Lu, Y., Li, K., Zhang, N., Yu, J., Miao, S., Wang, L., Song, W., 2023. Identification of quiescent FOXC2+ spermatogonial stem cells in adult mammals. *Elife* 12, RP85380. <https://doi.org/10.7554/eLife.85380>
- Webster, K.E., O’Bryan, M.K., Fletcher, S., Crewther, P.E., Aapola, U., Craig, J., Harrison, D.K., Aung, H., Phutikanit, N., Lyle, R., Meachem, S.J., Antonarakis, S.E., de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Peterson, P., Carroll, B.J., Scott, H.S., 2005. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4068–4073. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500702102>
- Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., Wang, Y., 2016. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget* 7, 10606–10615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7218>
- Yoshihara, M., Araki, R., Kasama, Y., Sunayama, M., Abe, M., Nishida, K., Kawaji, H., Hayashizaki, Y., Murakawa, Y., 2017. Hotspots of De Novo Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 21, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.060>
- Yuan, S., Huang, T., Bao, Z., Wang, S., Wu, X., Liu, J., Liu, H., Chen, Z.-J., 2022. The histone modification reader ZCWPW1 promotes double-strand break repair by regulating cross-talk of histone modifications and chromatin accessibility at meiotic hotspots. *Genome Biol* 23, 187. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02758-z>
- Zamudio, N., Barau, J., Teissandier, A., Walter, M., Borsos, M., Servant, N., Bourc’his, D., 2015. DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination. *Genes Dev* 29, 1256–1270. <https://doi.org/10.1101/gad.257840.114>

Figures

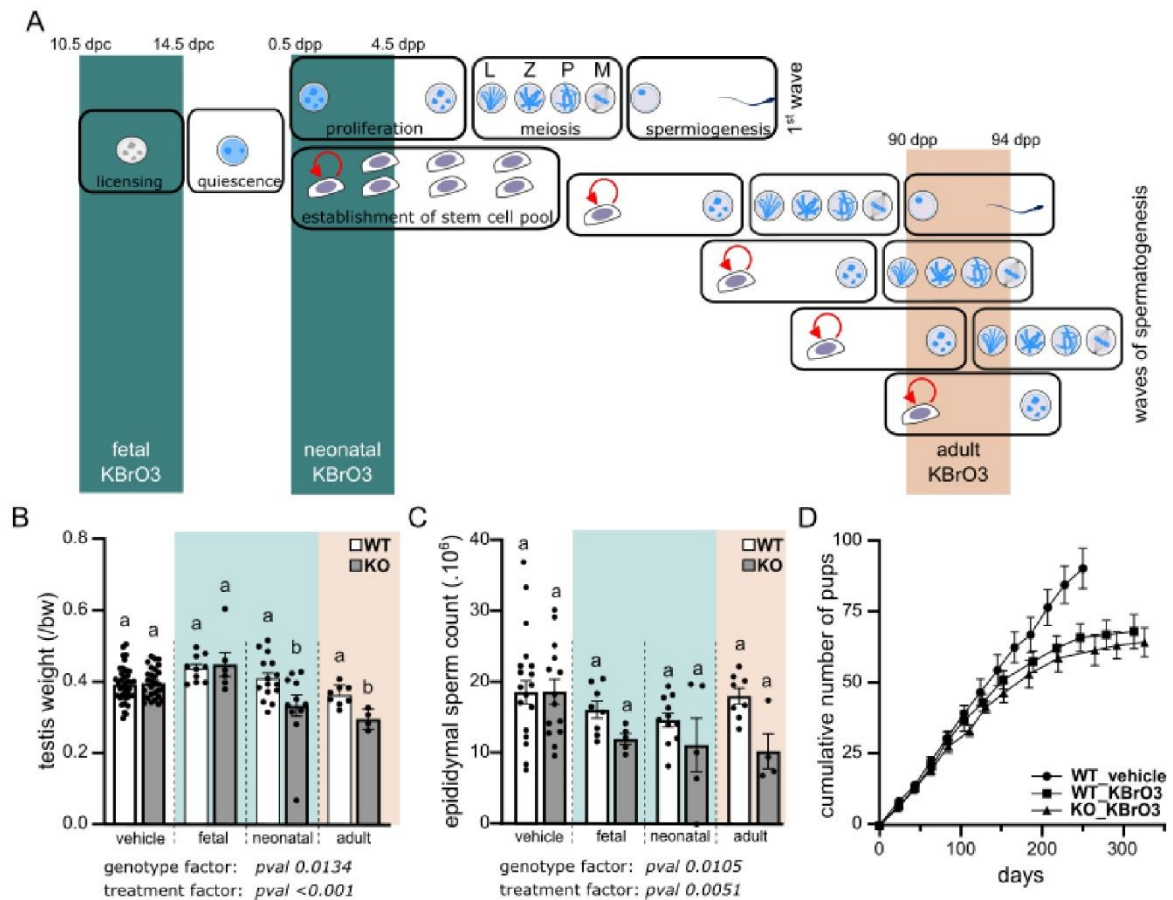


Figure 1. Neonatal oxidative DNA damage impairs global fertility in mice. (A) Model of exposure: OGG1 WT and KO mice were exposed to potassium bromate (KBrO₃) for four days during key moments of germ cell differentiation *i.e.* fetal, neonatal or adult life. **(B)** Ratio of testicular weight to body weight of 3- to 6-month-old male mice. **(C)** Epididymal sperm count (two epididymis). For B and C, the bars shows the mean \pm s.e.m. Each dot represents individual value (two-way ANOVA and different letters indicates significant difference using Tukey's test).

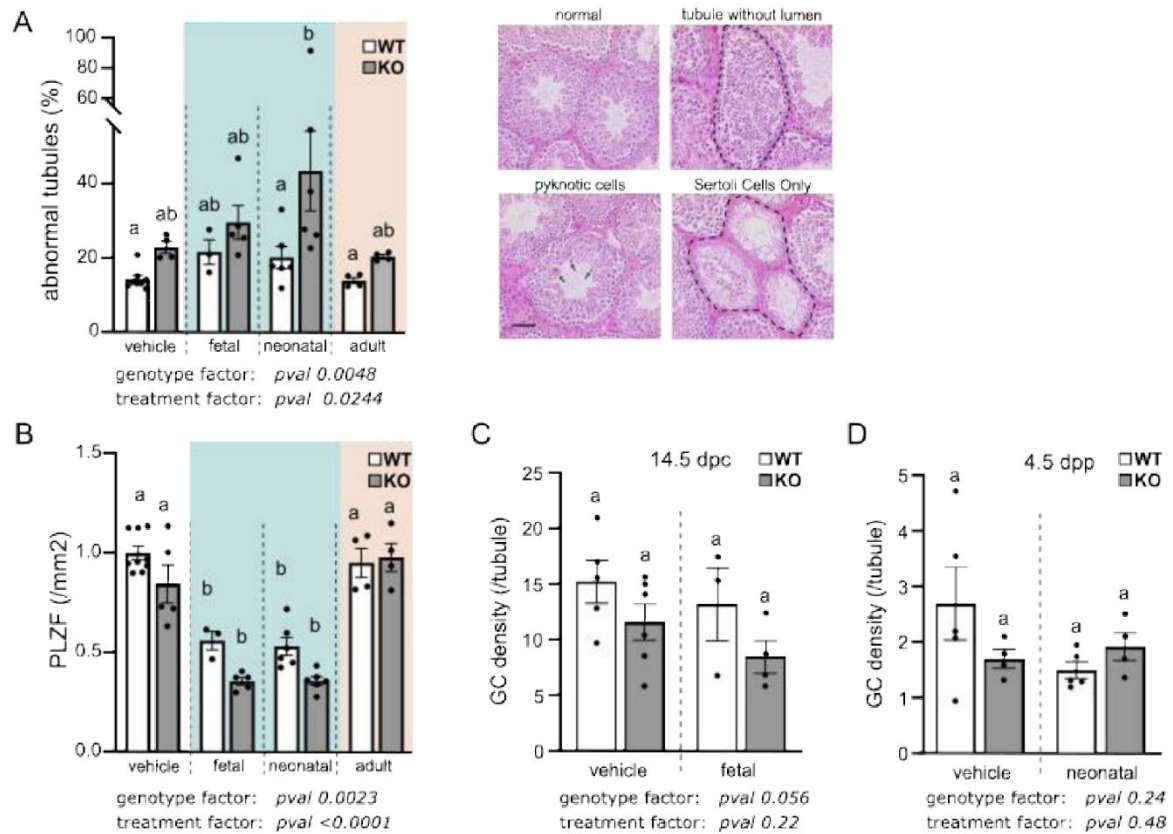


Figure 2. Neonatal oxidative DNA damage induces spermatogonial stem cell loss in adult testis.

(A) Left: Percentage of seminiferous tubules showing morphological abnormalities in testes sections of 3-month-old mice. Each point is the mean of 2/3 sections per individual with an average of 146 tubules per section. Right: Haematoxylin and eosin staining of testes sections from 3-month-old mice. Scale bar: 50 μ m. **(B)** PLZF density in adult testis (3- to 6-month-old). Each point represents the mean of 20 tubules at stage IX or X per individuals related to the average of OGG1 WT mice of its type of exposure. **(C)** DDX4 density at 14.5 dpc. Each point is the mean of 2/5 sections per individuals with an average of 18 tubules by section. **(D)** TRA98 density at 4.5 dpp. Each point is the mean of 5 sections per individuals with an average of 150 tubules by section. The bars shows the mean \pm s.e.m. Each dot represents individual value (two-way ANOVA and different letters indicates significant difference using Tukey's test).

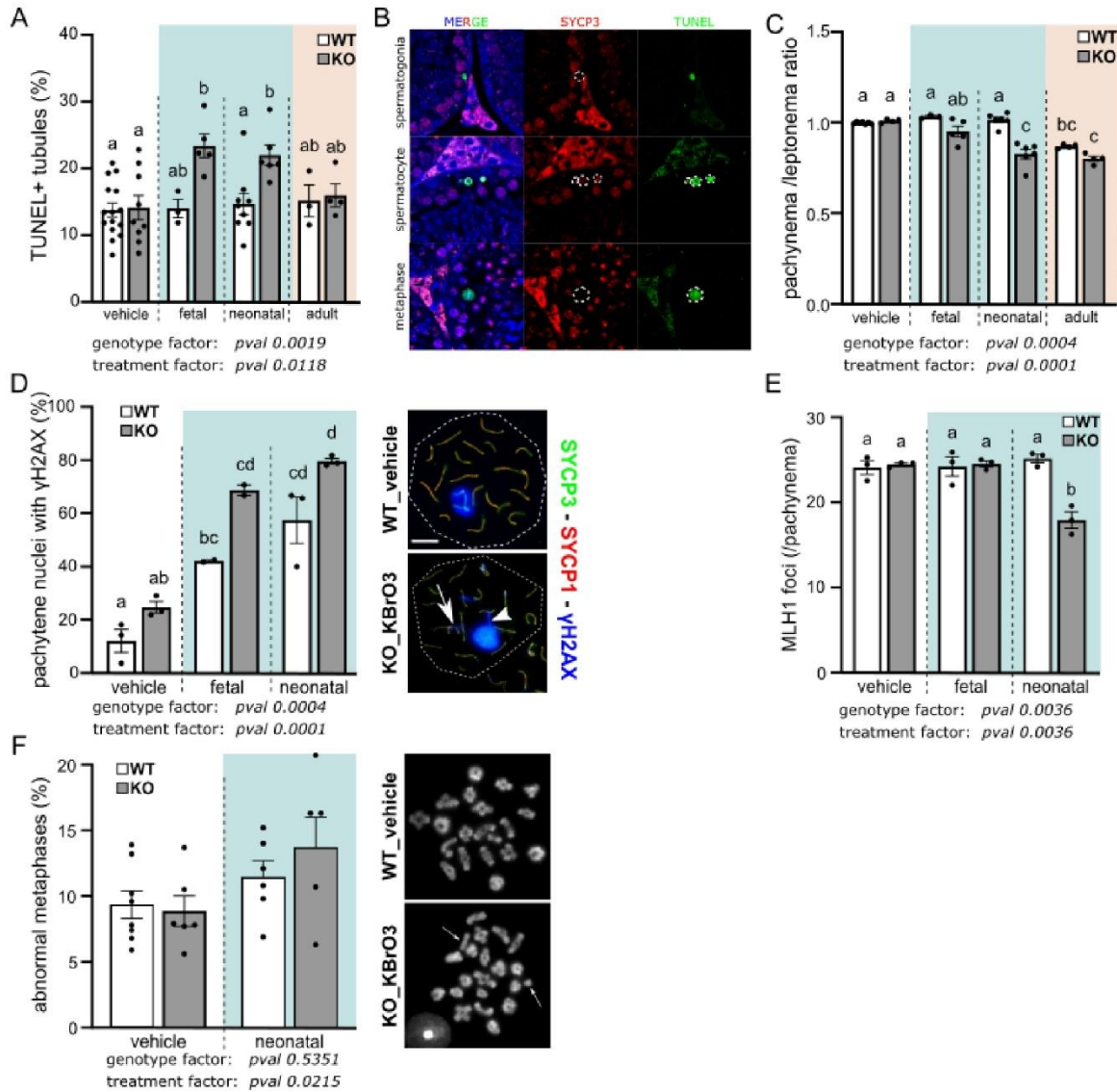


Figure 3. Oxidative neonatal DNA damage impairs meiosis. (A) Proportion of seminiferous tubules in adult testes containing TUNEL positive cells. Each point is the mean of 2/3 sections per individual with an average of 108 tubules per section. (B) Representative pictures of TUNEL-positive cells in seminiferous tubules. SYCP3 co-immunostaining was performed to detect meiotic germ cells. (C) Ratio of pachytene spermatocytes to leptotene spermatocytes in stage IX & X of the seminiferous epithelium. Pachynema and leptotene were detected based on the γ H2AX immunostaining. Each point is the mean of 20 tubules from two sections per individual. (D) Left: percentage of pachytene cell nuclei with persistent γ H2AX foci on autosomes. Spermatocytes were staged thanks to a SCP3/SCP1 staining. Each point represents the mean of 30/50 cells by individuals. Right: representative pictures of γ H2AX immunostaining. Upper: spermatocyte from OGG1 WT vehicle-treated mice with normal γ H2AX staining. Lower: spermatocyte from OGG1 KO KBrO3-treated mice with persistent γ H2AX

staining on autosomes (arrow) or between autosome and sex body (arrowhead). Scale bar: 1 μm . **(E)** Number of MLH1 foci per pachytene spermatocytes on testis spreads. Each point represents the mean of the number of MLH1 foci for 30/40 pachynema cells by individual. **(F)** Left: percentage of metaphases I presenting at least one unpaired bivalent. Each point represents the mean of 50/90 cells by individual. Right: representative image of spermatocytes metaphase I spread, after DAPI staining, from OGG1 WT vehicle-treated mice and OGG1 KO KBrO₃-treated mice. Arrows show unpaired X-Y univalent. For A-F, the bars shows the mean \pm s.e.m. (Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison, different letters correspond to significant difference).

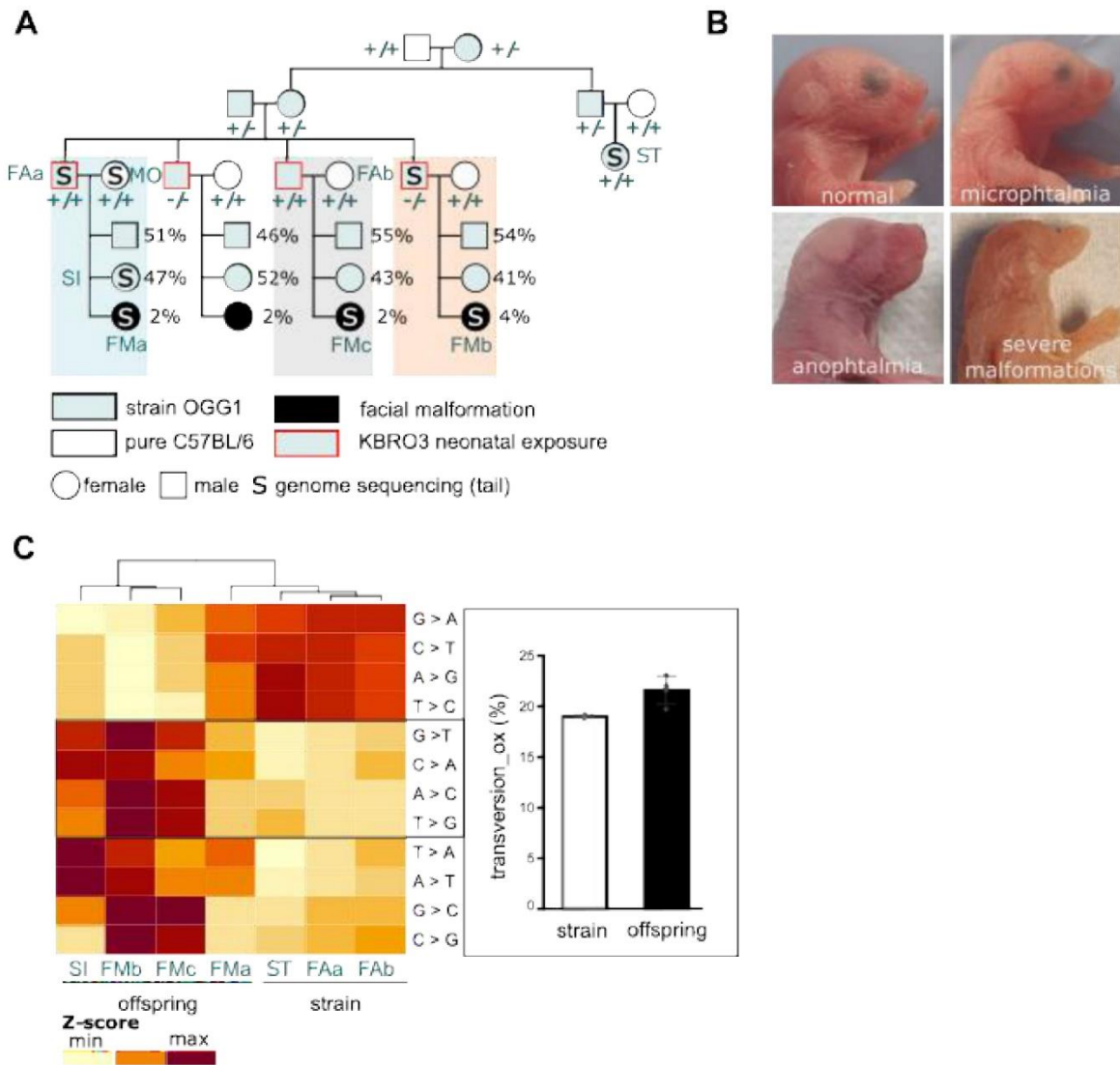
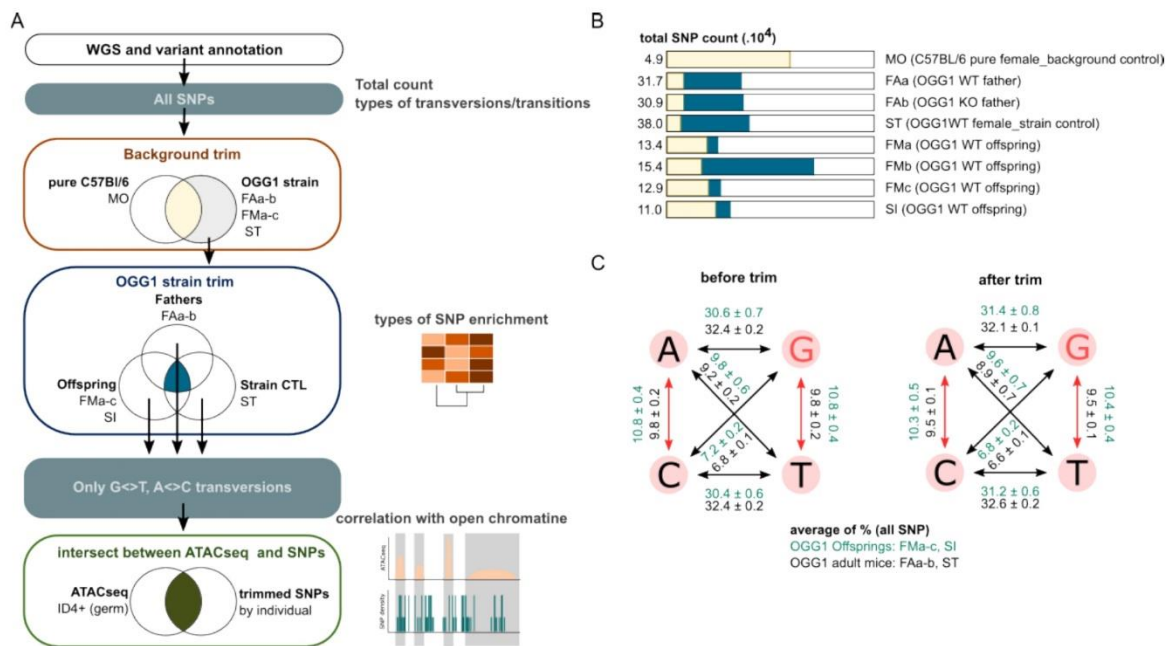
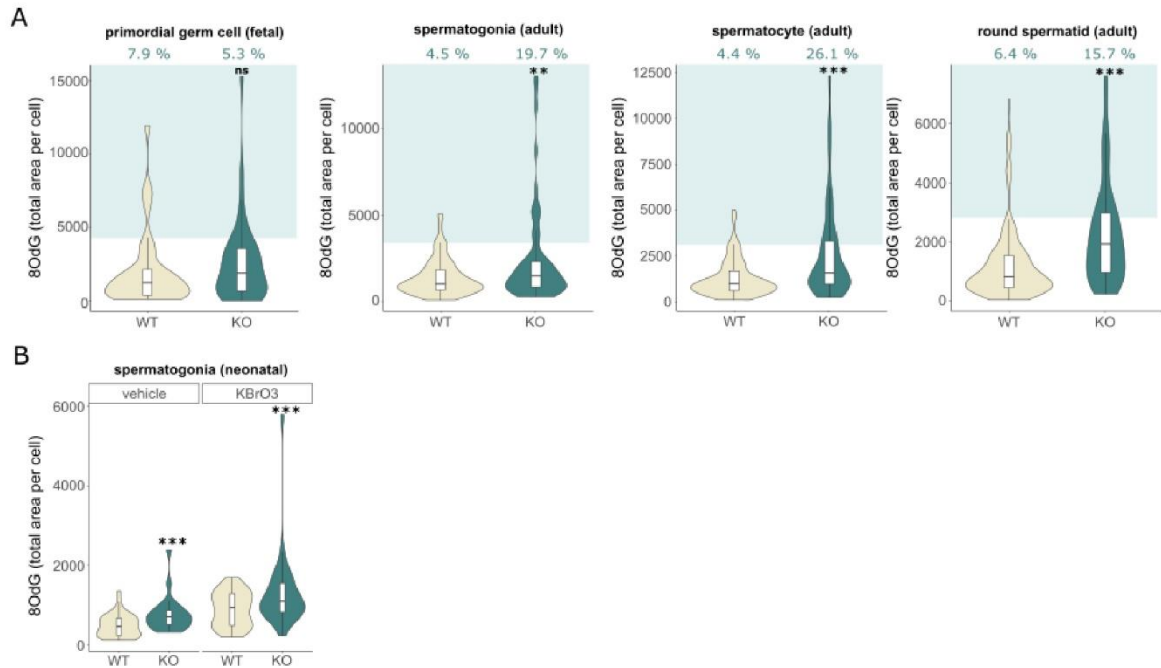


Figure 4. Oxidative neonatal damage induce transmissible *de novo* point mutations that could induce facial malformations in G1 progeny. (A) Pedigree of malformed mice and sequencing strategy. Four independent matings were established between C57Bl/6j pure female with OGG1 WT or KO male mice exposed to KBrO3 during neonatal period (red squares). In each crosses, facial abnormalities were observed in 2-4% of female pups (black circles). Whole-genome sequencing (WGS) was performed on tail-derived DNA on 8 individuals: one OGG1 WT KBrO3-treated father (FAa) and one untreated mother (MO) with one normal (SI) and one malformed (FMa) female pup (Family 1), one OGG1 KO KBrO3-treated father (FAb) and one malformed (FMb) female pup (Family 2), one malformed female pup (FMc) obtained from a cross with a WT KBrO3 treated male and a OGG1 WT adult female as OGG1 strain reference (ST). **(B)** Representative pictures of facial malformations observed in pups. **(C)** Left: Heatmap showing levels type of SNVs and hierarchical clustering of the Spearman correlation using WGS analysis after trimming. Right: proportion of G<>T and C<>A mutation (transversion_ox) in offspring (mean of FMa-c and SI) compared to mice derived to OGG1 strain (mean of FAa-b, ST).

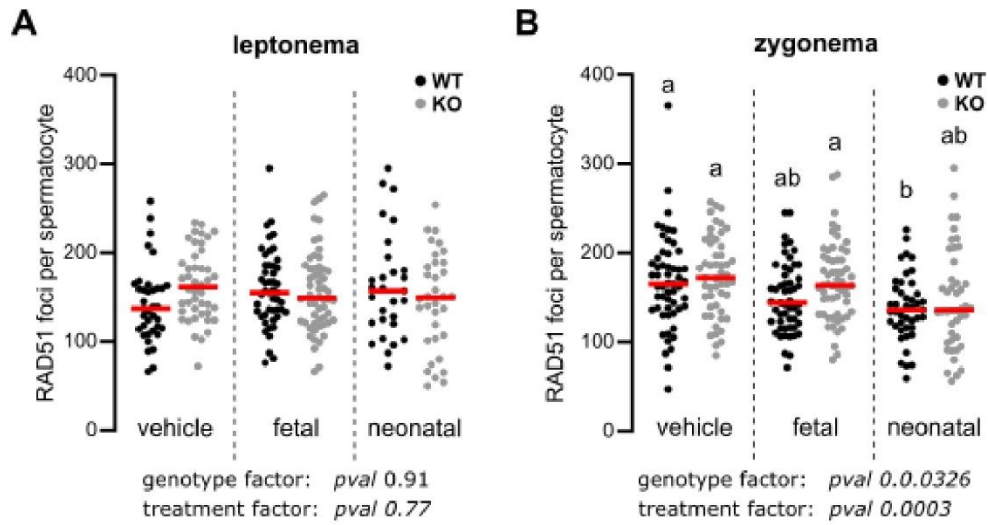
Supplementary figures



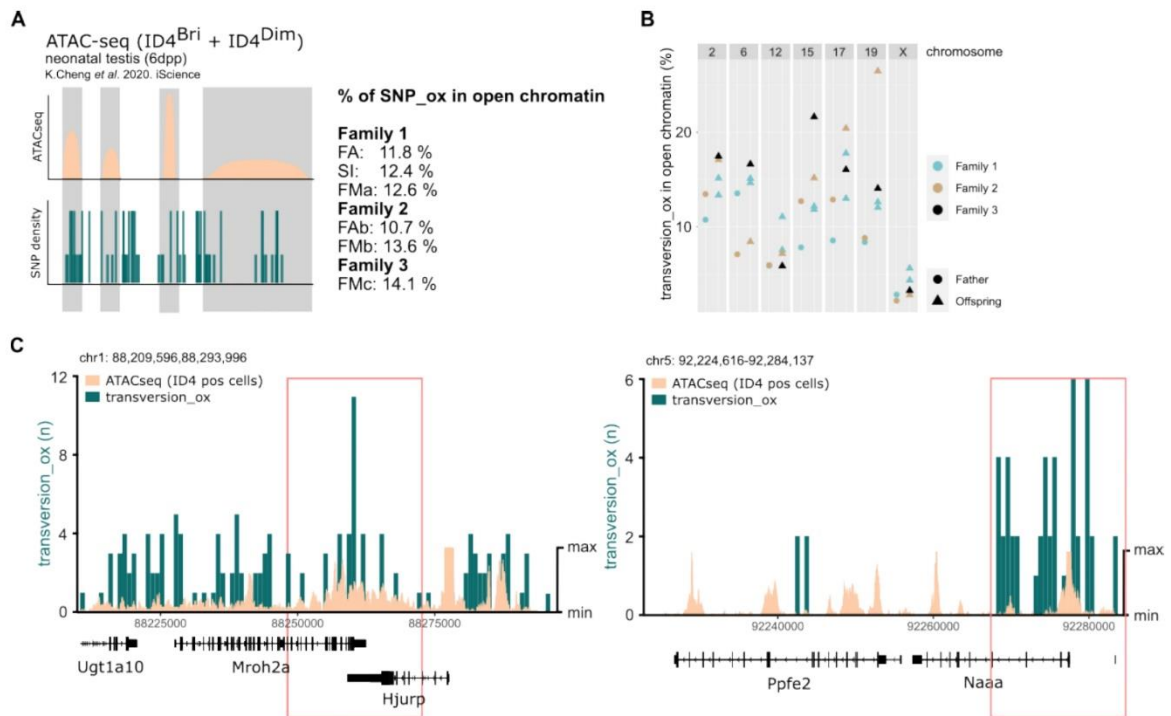
Supplementary Figure 1. (A) Working model for bioinformatics analyses. Whole genome sequencing (WGS), alignment and variant detection/annotation were performed on tail DNA from pure C57BL/6 adult female (MO), OGG1 adults (FAa, FAb, ST) mice and pups (FMa, FMb, FMc, SI). Two rounds of SNV trims were performed. First, to subtract SNV from C57BL/6 background (background trim), common SNVs between pure C57BL/6 mice and the others were subtracted. To subtract SNVs from OGG1 strain (strain trim), common SNVs between all OGG1 mice were subtracted. After filtering on G<>T and A<>C transversions (putative transversions induced by 8OdG lesions), correlation with ATACseq data obtained from ID4-Brigh and -dim-positive cells from 6 dpp testes (Cheng et al., 2020) was performed. **(B)** SNV total count per individual and proportion of common SNVs retrieved in C57BL/6 background (yellow) and OGG1 strain (blue). **(C)** Distribution of transitions and transversions among SNVs in trimmed and non-trimmed data. Black and blue numbers correspond to the average between OGG1 adult mice (FAa, FAb and ST) and OGG1 offspring (FMa, FMb, FMc, SI) respectively.



Supplementary Figure 2. (A) Total surface (in pixel) of 8OdG per germ cells in fetal (12.5 dpc) and adult testes (3 months-old) from OGG1 WT and KO mice. In fetal testis, TRA98 immunostaining was performed to detect primordial germ cells. In adult testis, SYCP3 immunostaining was performed to detect spermatocytes. Spermatogonia and round spermatids were detected based on their nuclear morphology and cell size. Upper percentage represents proportion of germ cells with 8OdG total surface more than OGG1 WT mean + 2SD. **(B)** Total surface (in pixel) of 8OdG per germ cells in neonatal testes (4.5 dpp) from OGG1 WT or KO KBrO₃- or vehicle-treated mice. Violin Plot combined with box plot (median and interquartile ranges) from 30 cells per individual (n=2 per genotype). ns: non significant, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (Student's t test_two-tailed, compared to WT on the same age and same condition).



Supplementary Figure 3. (A) Number of RAD51 foci per spermatocyte in leptotene stage. Each point represents one spermatocyte. In each condition, 30/55 cells were counted from 3 different individuals. **(B)** Number of RAD51 foci per spermatocyte in leptotene stage. In each condition: 45/55 cells were counted from 3 different individuals. For B and C, individual point represents one spermatocyte and red bar shows the mean (Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison, different letters correspond to significant difference).



Supplementary Figure 4. (A) Study design. Relationship between open chromatin regions (OCR) detected by ATAC-seq in ID4-Bright and -Dim neonatal SSCs (6 dpp) and *de novo* transversion_ox observed in offspring of neonatally KBrO₃-exposed males. Percentage of transversion_ox included in OCR per total SNVs. (B) Percentage of transversion_ox included in OCRs by chromosome for 2, 6, 12, 15, 17, 19 and X chromosome. Representative tracks in chr1 and chr5 regions overlapping transversion_ox count (blue) and ATAC-seq peaks (orange) from ID4 positive neonatal SSCs. Left Y-axis was chosen for optimal visualization of ATAC-seq peaks. Right Y-axis represent cumulative transversion_ox in 1kb-tracks in offspring.

Partie III – Les lésions oxydatives de l’ADN entraîne un retard de différenciation des cellules germinales dans des testicules fœtaux humains

Le cancer testiculaire est le cancer le plus fréquent chez les hommes jeunes et est très majoritairement d’origine germinale : on parle de tumeurs des cellules germinales testiculaires (TCGT). Son incidence a augmenté de manière très rapide dans la plupart des pays industrialisés, ce qui suggère fortement un rôle de l’environnement dans leur étiologie. Bien qu’il s’agisse d’un des cancers les mieux soignés, ces traitements conduisent à des désordres de fertilité.

Les gonocytes sont des cellules germinales pluripotentes et prolifératives qui expriment des facteurs de cellules souches tels que OCT3/4 (codé par *POU5F1*), NANOG, AP2γ (TFAP2C) et PDPN (podoplanine). Suite à la déméthylation quasi-globale de leur génome, les gonocytes vont acquérir la compétence gamétique, programme transcriptionnel spécifiquement germinale avec expression de gènes tels que DDX4, DND1 et NANOS2. Celle-ci se déroule entre la 7^{ème} et la 9^{ème} semaine de grossesse dans le testicule fœtal humain. Après cela, les cellules germinales arrêtent de proliférer et migrent au contact de la lame basale des tubules séminifères. Elles sont alors appelées prospermatogonies et expriment des marqueurs illustrant leur différenciation tels que MAGEA4. Chez l’Homme, la différenciation des cellules germinales dans la gonade fœtale est très asynchrone et il n’est pas rare d’observer à la fois des cellules germinales indifférenciées et des prospermatogonies dans un testicule.

Toute perturbation de la différenciation fœtale des cellules germinales, notamment une perte prématurée du programme de pluripotence, peut avoir des conséquences sur la survie germinale et donc sur la fertilité à l’âge adulte. A l’inverse, de nombreux éléments suggèrent qu’un défaut de différenciation des cellules germinales fœtale pourrait être à l’origine de la lésion initiale des TCGT, le carcinome in situ (CIS). En outre, la corrélation entre taux de polluants dans les fluides biologiques maternels et augmentation du risque de développer un TCGT laisse à penser que CIS pourrait être induit par une exposition prénatale à certains polluants environnementaux. Toutefois, l’étude du lien entre exposition fœtale, défaut de différenciation germinale et tumorigenèse est entravée par le manque de modèles expérimentaux appropriés – les souris ne développant pas de cancer testiculaire spontanément – et par le manque d’études à long terme chez l’Homme. Ainsi, les mécanismes sous-jacents restent globalement mal compris.

Pour répondre à ces problématiques, nous avons développé un modèle expérimental au laboratoire combinant xéno greffes de testicules fœtaux humains et transplantation des cellules germinales dans des testicules murins adultes. Ainsi, par xéno greffes dans le dos de souris athymiques, nous avons tout d’abord exposé sur le long terme (jusqu’à 18 semaines), des testicules fœtaux humains

à un mélange de polluants environnementaux : un phtalate, le DEHP et un bisphénol, le BPA, deux des plastifiants les plus répandus. Par ces travaux, présentés en annexe, nous démontrons que l'exposition conjointe au DEHP et au BPA induit des défauts de différenciation des cellules germinales dans les testicules fœtaux humains, à savoir une augmentation du nombre de cellules exprimant encore des facteurs de pluripotence (AP2 γ -positives) et une augmentation du nombre de prospermatogonies anormalement prolifératives. De plus, par des analyses omiques (transcriptome et méthylome), nous observons une signature épigénétique similaire à celle des tumeurs germinales, notamment une hypométhylation globale des îlots CpG et l'expression anormale des marqueurs méiotiques.

Par la suite, nous avons transplanté les cellules germinales humaines exposées dans un compartiment testiculaire de souris adultes, niche somatique propice à récapituler la différenciation des cellules germinales de l'état souche à l'état le plus différencié. Nous observons que les cellules germinales fœtales exposées au mélange DEHP/BPA sont plus susceptibles de développer un séminome une fois transplantées dans un contexte somatique adulte. Ces travaux constituent la première preuve que l'exposition à certains polluants environnementaux peut engendrer des lésions irréversibles dans les cellules germinales fœtales humaines, qui aboutissent à une réponse tumorigénique pendant la période pré-pubertaire.

La plupart des polluants environnementaux partageant une activité pro-oxydante, et en considérant l'impact des dommages oxydatifs sur la gamétogenèse mâle chez la souris, nous avons souhaité étudier l'impact de la survenue de lésions oxydatives de type 8-OdG sur la différenciation des cellules germinales fœtales mâles humaines. Pour ce faire, nous avons exposé, par xénogreffes et pendant plusieurs semaines, des testicules fœtaux humains à une substance pro-oxydante décrite pour induire la formation de 8-OdG, le bromate de potassium (KBrO₃). De la même manière que pour le mélange de plastifiants, nous observons histologiquement un retard de différenciation des cellules germinales par augmentation du nombre de cellules germinales pluripotentes (AP2 γ -positives) mais sans persistance de prospermatogonies prolifératives (Figure 34). Ainsi, ces résultats laissent à penser que si nous transplantions ces cellules germinales exposées au KBrO₃ dans des testicules murins adultes, nous retrouverions une susceptibilité accrue à la formation de séminomes et que, plus globalement, le mécanisme d'action des polluants environnementaux dans la survenue des cancers testiculaires pourrait être médié par les lésions oxydatives de l'ADN.

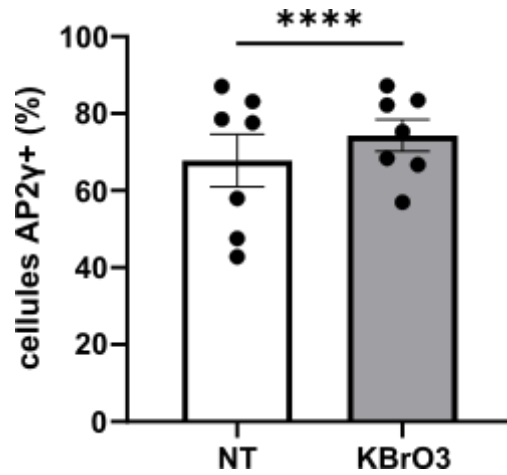


Figure 34. Maintien des cellules germinales humaines mâles dans un état de pluripotence après une exposition longue au bromate de potassium.

Proportion du nombre de cellules germinales pluripotentes immuno-marquées par AP2 γ dans des testicules fœtaux humains exposés pendant plusieurs semaines ou non au bromate de potassium (KBrO3) grâce à un modèle de xénogreffes. Le nombre de cellules AP2 γ -positives a été rapporté au nombre de cellules germinales différenciées (MAGEA4-positives). Test exact de Fisher, $p < 0.0001$. NT = non traité.

Discussion et Conclusion

Discussion

Bisphénols, infertilité et oxydation

Les gamètes, cellules hautement spécialisées, sont l'élément central de la fertilité. La différenciation des cellules germinales est un processus initié pendant la vie fœtale et qui requiert la mise en place d'une cascade d'évènements finement régulés, dont la méiose, une particularité du lignage germinal. Leur bon déroulement est primordial afin de garantir la production, en nombre suffisant, de gamètes de bonne qualité. Ainsi, toute altération survenant pendant la mise en place et la différenciation des cellules germinales risque de nuire à la fertilité de l'individu ou la santé de ses descendants. Malheureusement, il n'est plus à démontrer que de multiples facteurs exogènes peuvent altérer ce processus, dont les polluants environnementaux.

Nous sommes continuellement exposés à un mélange de substances potentiellement nocives pour notre santé et notre fertilité. Parmi eux, le bisphénol A est l'un de ceux dont les effets, notamment sur la fonction reproductrice, ont été le mieux caractérisés. La législation limitant son utilisation a poussé les industriels à avoir recours à des analogues structuraux du BPA, substances dont nous connaissons assez peu les effets. Ainsi, la première partie de cette thèse avait pour objectif d'étudier l'impact de deux substituts du BPA, le BADGE et le BPAF, sur l'ovogenèse chez la souris et de comprendre si un mécanisme de toxicité commun aux bisphénols existait.

Avec le BADGE et le BPAF, comme cela avait été décrit pour le BPA, nous observons des altérations de la folliculogénèse et de l'ovogénèse. Nous observons notamment divers défauts méiotiques, particulièrement de la recombinaison homologue et de la ségrégation des chromosomes homologues en métaphase puisque nous décrivons une augmentation du nombre de chiasma par bivalents et du nombre d'ovocytes aneuploïdes. Des défauts similaires sont couramment observés après exposition au BPA (Hunt et al., 2012, 2003; Lawson et al., 2011; H.-Q. Zhang et al., 2012). Le BPA étant un perturbateur endocrinien œstrogéno-mimétique, différentes études proposent que les effets méiotiques observés découlent d'une action *via* les récepteurs aux œstrogènes. Cette hypothèse a été formulée par l'équipe de Patricia Hunt, qui observe des défauts méiotiques similaires (problème de *synapsis* et augmentation du nombre de foyers MLH1) dans les ovaires fœtaux de souris déficientes pour ER β (Susiarjo et al., 2007). De même, il a été montré que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes en plus du BPA permet de protéger les cellules méiotiques chez le mâle comme chez la femelle (Liu et al., 2013; Yu et al., 2018). A l'inverse, dans l'ovocyte de poule, le BPA renforce spécifiquement l'expression du récepteur β aux œstrogènes (ER β) au niveau ARNm et protéique (Yu et al., 2018). Ces résultats contradictoires laissent penser que la dérégulation de la voie

de signalisation des ER, de manière agoniste ou antagoniste, puisse induire des effets délétères sur la méiose.

Les récepteurs aux œstrogènes sont des récepteurs nucléaires, qui sont donc capables de réguler l'expression génique par leur fixation au niveau de l'ADN. Or l'initiation et la progression méiotique sont dépendantes de l'expression d'un programme transcriptionnel précis, autorisé par l'effacement de la méthylation dans les CGP, processus d'abord passif et lié à la réplication, puis facilité par les enzymes TET. Nous avons alors souhaité étudier le profil transcriptionnel des ovogonies au cours de l'exposition aux bisphénols et notamment à leur entrée en méiose. Nous observons un retard d'entrée en méiose associé à des dérégulations transcriptionnelles et de la méthylation de l'ADN au moment de l'entrée en méiose après exposition au BADGE et au BPAF. Les polluants environnementaux, dont le BPA, sont des substance reconnus comme pouvant interférer avec le cycle cellulaire et avec les enzymes de déméthylation (Xu et al., 2002; Zhu et al., 2020). Nous formulons ainsi l'hypothèse que les bisphénols induisent des altérations transcriptionnelles par des perturbations du paysage épigénétique, ce qui perturbe la transition prolifération/différenciation et la méiose.

En outre, le retard d'entrée en méiose pourrait aussi résulter d'altérations directes du cycle cellulaire. En effet, il a été démontré, dans des lignées cellulaires humaines ou des ovogonies ovines cultivées *ex vivo*, que le BPA est capable d'induire une diminution de l'expression de cyclines, protéines indispensables à l'avancée du cycle cellulaire, ou promouvoir la présence d'inhibiteurs des cyclines tels que p27 ou p21 (respectivement p27^{Kip1} et p21^{Cip1}, p21 pouvant aussi être appelée CDKN1A – *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) (Bilancio et al., 2017; Loup et al., 2022). La régulation de ces facteurs participant activement à la transition de la mitose vers la méiose (Farini and De Felici, 2022), cela nous laisse penser qu'une perturbation de leur expression dans les ovogonies peut induire des défauts d'entrée en méiose.

De manière générale, de nombreuses autres substances sont capables d'induire des défauts méiotiques similaires (Gely-Pernot et al., 2017; González-Sanz et al., 2020; Liu et al., 2017), y compris des composés qui ne sont pas considérés comme perturbateurs endocriniens et qui n'interfèrent donc en théorie pas avec la signalisation oestrogénique (Shin et al., 2019; Q. Xu et al., 2022). De plus, le BADGE, contrairement au BPAF, semble avoir une affinité bien plus faible voir infime pour les ERβ (Grimaldi et al., 2019). Ainsi, ces données nous laissent supposer que les défauts observés ne seraient qu'en partie médiés par les récepteurs aux œstrogènes et que d'autres mécanismes d'actions pourraient être impliqués.

De manière intéressante, l'activation de la signalisation des œstrogènes peut conduire à la production de lésions oxydatives de l'ADN par l'induction d'un déséquilibre redox ou d'une explosion

oxydative génomique pendant la transcription (Perillo et al., 2008; Roy et al., 2007). Nous confirmons que l'exposition à des xéno-œstrogènes de synthèse puisse induire la formation de dommages oxydatifs de l'ADN puisque nous observons une augmentation du nombre de 8OdG, la lésion la plus couramment observée au niveau de l'ADN après oxydation, dans les ovogonies murines prolifératives après administration du BADGE ou du BPAF. Nous nous sommes alors penchés sur l'impact de ces dommages oxydatifs de l'ADN de type 8OdG sur l'ovogenèse par deux procédés différents. Tout d'abord, chez la souris invalidée pour OGG1, nous observons, comme avec les bisphénols, un retard d'entrée en méiose, des défauts de recombinaison homologue et des gamètes aneuploïdes. Ensuite, nous observons que l'exposition à une substance pro-oxydante, le bromate de potassium, conduit également à un délai dans l'initiation méiotique. Enfin, l'administration d'un antioxydant, le N-Acétylcystéine (NAC), en parallèle de l'exposition au BADGE ou au BPAF permet de restaurer ce phénotype. Ensemble, ces données suggèrent que les dommages oxydatifs de l'ADN produits précocement au cours du développement embryonnaire puissent interférer avec la différenciation des cellules germinales femelles chez la souris et ainsi diminuer la fertilité des individus. Nous proposons également, pour la première fois, que les effets délétères des bisphénols sur l'ovogenèse puissent être médiés par la formation de lésions oxydatives de l'ADN, dépendamment ou non de l'activation de la signalisation œstrogénique.

Au niveau mécanistique, de nombreuses questions restent en suspens. La 8OdG est décrite pour induire de la mutagenèse au cours de la réplication en fonction de la conformation qu'elle adopte dans le site actif des ADN / ARN polymérase (Cheng et al., 1992). Dans un système équilibré, une 8OdG conduit à des transversions de l'ADN dans 1 à 5% des cas (Cheng et al., 1992; Tan et al., 1999). De même, la présence de 8OdG au niveau de l'ADN conduit à des mutations transcriptionnelles au niveau des ARNm (Brégeon et al., 2003). Après exposition au BADGE ou au BPAF, nous observons environ 3000 gènes présentant des altérations de l'épissage alternatif de leurs ARN. Comme les séquences consensus d'épissage alternatif, en 5' et en 3' de l'intron, comportent des guanines, nous pouvons faire l'hypothèse que l'introduction de mutations dans l'ADN ou dans l'ARNm, dues à l'oxydation de guanines, pourrait être au moins en partie à l'origine de ces erreurs d'épissage. Nous observons d'ailleurs, sur la base de données d'OxiDIP-seq obtenues par Amente *et al.* dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Amente et al., 2019), que certains gènes différenciellement exprimés pouvaient chevaucher avec des régions de l'ADN sensibles à l'oxydation, susceptibles donc d'être mutées à la suite de l'occurrence d'une 8OdG.

En outre, les guanines présentes au niveau de l'ARN peuvent aussi être oxydées, ce qui aboutit à la formation de o⁸G. Trois études évoquent le fait que la 8-oxoguanine serait, en fonction du type cellulaire et du modèle d'étude, 2 à 25 fois plus abondante dans l'ARN que dans l'ADN (Hofer et al.,

2005; Mangerich et al., 2012; Wu and Li, 2008). Sur la base de ces résultats et étant donné qu'il peut y avoir jusqu'à 4 fois plus d'ARN que d'ADN dans les cellules (Hilf, 1977), la quantité de guanines oxydées dans l'ARN pourrait, dans les conditions les plus extrêmes, être 100 fois plus élevée que dans l'ADN. L'impact de la o⁸G sur la machinerie d'épissage n'est, à ma connaissance, pas détaillé mais il est facile de penser, compte tenu des effets des guanines oxydées sur les machineries de réplication et de transcription, que sa présence ne sera pas anodine. Il serait donc intéressant d'étudier l'état d'oxydation et la stabilité des ARN après exposition aux bisphénols. Nous pourrions en sus utiliser une drogue capable d'inhiber la transcription (Logan et al., 1989) afin de distinguer les effets induits directement par l'activité pro-oxydante du PE et ceux découlant d'erreurs des machineries cellulaires.

En parallèle des études menées chez la souris, des travaux du laboratoire ont montré que l'exposition d'ovaires fœtaux humains par xénogreffe au BADGE engendre également une diminution du pourcentage de cellules méiotiques à un équivalent 30 SG. Bien qu'une grande variabilité interindividuelle ait été observée dans les gonades humaines, il semblerait que l'exposition aux bisphénols induise la même tendance au retard d'entrée en méiose dans les cellules germinales humaines que ce que nous avons observé chez la souris.

Dans la gonade mâle, la différenciation germinale fœtale est illustrée par l'entrée en quiescence. Dans les travaux présentés en annexe, nous démontrons que l'exposition conjointe à deux plastifiants, le DEHP et le BPA, induit une augmentation du nombre de cellules exprimant encore des facteurs de pluripotence (AP2 γ -positives) et une augmentation du nombre de prospermatogonies anormalement prolifératives, ce qui indique une perturbation des mécanismes d'induction de la quiescence. Ainsi, comme dans l'ovaire murin et humain, l'exposition à divers polluants environnementaux semble capable d'induire des défauts de différenciation des cellules germinales dans les testicules fœtaux humains. En dehors des défauts de fertilité, des altérations de la différenciation germinale fœtale sont associées, chez l'Homme, à la survenue de cancers testiculaires. Nous observons d'ailleurs dans l'article présenté en annexe, une augmentation du nombre de séminomes après transplantation de cellules germinales humaines exposées au BPA/DEHP dans un contexte permettant le début de la spermatogénèse.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre qu'outre les conséquences futures, une exposition fœtale à divers PE entraîne un maintien de la pluripotence et des défauts de différenciation des cellules germinales, indépendamment du contexte somatique gonadique (ovaire et testicule) et de l'espèce (humain et souris). Ceci suggère fortement un mécanisme d'action commun, et nous proposons que les dommages oxydatifs de l'ADN soient, au moins en partie, engagés. Afin d'étudier leur implication dans la différenciation mâle, nous avons exposé des testicules fœtaux humains au KBrO₃ par

xénogreffe. De même qu'après exposition au BPA/DEHP, nous observons une persistance des cellules indifférenciées dans les testicules fœtaux humains. Il nous a alors paru primordial de détailler l'impact des lésions oxydatives de l'ADN sur l'ensemble de la différenciation germinale mâle. Pour cela, nous avons conjointement utilisé le modèle de souris déficientes pour OGG1 avec l'administration de bromate de potassium. Une exposition courte au bisphénol, de quatre jours seulement, ayant suffi à induire des défauts méiotiques chez la femelle, nous avons conservé ce même temps d'exposition pour le mâle.

Impact des lésions oxydatives de l'ADN sur la différenciation des cellules germinales chez le mâle

Nous observons un effet global de l'exposition au KBrO₃ sur le nombre de spermatozoïdes épидидymaires mais nous n'observons une diminution significative du poids des testicules que chez les animaux déficients pour OGG1 exposés en période néonatale ou à l'âge adulte. Si l'effet de l'inactivation d'*Ogg1* sur les testicules n'a pas été décrit, deux études réalisées chez le rat se sont intéressées à l'impact du KBrO₃ sur le testicule (Elsheikh et al., 2016; Khan et al., 2012). La première décrit qu'une exposition pendant 5 semaines débutée un peu avant la puberté induit une diminution franche du poids des testicules et des épидидymes ainsi que diverses altérations de la structure des tubes séminifères. La comparaison semble toutefois complexifiée par le fait que l'exposition est réalisée sur une longue période et avec une dose élevée. De fait, ils observent également une diminution de plus de la moitié du poids corporel, ce que nous n'observons pas dans notre modèle expérimental. La seconde étude rapporte une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes, ainsi qu'une augmentation, légère mais significative, du poids des testicules. Ils associent cela à une peroxydation lipidique. Effectivement, même si le KBrO₃ est connu pour induire majoritairement des 8OdG et que nous observons une nette augmentation de ce dommage oxydatif dans nos cellules germinales après exposition, nous ne pouvons pas omettre que d'autres défauts puissent être générés dont un stress oxydatif global dans les cellules et une peroxydation lipidique (Ahmad et al., 2014; Chipman et al., 1998).

Le testicule, contrairement à l'ovaire, possède des cellules souches, capables, à la fois, de se renouveler et de nourrir la spermatogenèse en continu. Nous observons une diminution du nombre de cellules souches spermatogoniales après exposition fœtale et néonatale au KBrO₃, indépendamment de la présence d'OGG1. Nous n'avons pas encore pu déterminer le mécanisme par lequel la survenue de dommages oxydatifs de l'ADN entraîne une diminution du nombre de CSS dans le testicule adulte plusieurs mois plus tard. Notre première hypothèse est que le nombre de cellules germinales est diminué dès le moment de l'exposition, notamment car la production massive de 8OdG

pourrait induire une mort cellulaire, surtout en absence d'OGG1, ou un blocage du cycle cellulaire germinale (Fu et al., 2019; German et al., 2017; Oka et al., 2008; Youn et al., 2007). De manière surprenante, les densités de cellules germinales en fins d'expositions fœtales ou néonatales ne sont pas significativement différentes. Toutefois, il paraît envisageable que les dommages oxydatifs soient gérés sur le moment par la cellule germinale mais qu'au bout de quelques cycles de réplication, les défauts accumulés soient tels que la cellule finisse par être éliminée. Il serait donc intéressant de caractériser la quantité de cellules germinales à différents moments entre la fin de l'exposition et la vie adulte. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de spermatogonies TUNEL+ dans le testicule adulte. Une autre hypothèse repose sur le fait que les dommages oxydatifs créés pourraient perturber la différenciation des CSS. La présence de 8OdG peut impacter de manière conséquente, par de multiples mécanismes directs et indirectes, la transcription de l'ADN (Pour revue, Hahm et al., 2022, cf. figure 33). Or la différenciation des CSS repose sur l'expression d'un programme transcriptionnel finement régulé qui oriente les cellules sur la voie de la 1^{ère} vague de spermatogenèse ou la fondation du *pool* de CSS. On pourrait donc supposer que les prospermatogonies soient mal orientées. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons initié la collecte de cellules germinales en fin d'exposition fœtale dans l'optique d'étudier leur profil transcriptionnel par séquençage sur cellules uniques.

De manière intéressante, nous n'observons pas d'altération du nombre de cellules PLZF-positives après exposition au KBrO₃ à l'âge adulte ni de tubes séminifères présentant une morphologie anormale. Ceci laisse penser que la diminution du poids testiculaire observé chez les souris *Ogg1*^{-/-} exposées à l'âge adulte découlerait uniquement de problèmes survenant dans les cellules méiotiques, perturbations que nous observons. Ceci est en adéquation avec les défauts méiotiques observés après exposition de mâles adultes à divers polluants environnementaux (Gely-Pernot et al., 2015; Liu et al., 2013). Ceci interroge aussi sur le caractère permanent des défauts observés. En effet, si le *pool* souche n'est pas affaibli mais qu'il s'agit d'effets directs sur les cellules pré-méiotiques/méiotiques, nous pouvons supposer qu'au bout de quelques cycles de spermatogenèse, nous n'observerons plus d'effet dans les testicules de ces souris, contrairement à celles exposées précocement.

Chez la souris déficiente pour *Ogg1*^{-/-} exposée en vie néonatale au KBrO₃, nous observons, en plus de la diminution du nombre de spermatogonies, diverses altérations au cours de la méiose qui se traduisent par une disparition des cellules entre le stade leptotène et le stade pachytène. Dans le détail, nous observons tout d'abord une persistance de foyers γ H2AX dans les cellules au stade pachytène. Cette signalisation ne semble pas liée à un problème de synapsis du complexe synaptonémal et persiste sous forme de foyers répartis sur les autosomes, liant parfois deux autosomes entre eux ou un autosome avec la vésicule sexuelle. Cette persistance est le signe de

défauts au cours de la recombinaison homologue. L'étape initiale de la recombinaison homologue est la formation programmée de cassures double-brin de l'ADN. Des perturbations dans le nombre ou la position des cassures formées induit des altérations de recombinaison homologue (Qu et al., 2021). Nous nous sommes donc intéressés aux acteurs impliqués dont RAD51, une recombinase qui se fixe au niveau des CDB rapidement après leur résection. Nous n'observons pas de modification du nombre de foyers RAD51 au stade leptotène, ce qui semble signifier que le nombre de CDB formées n'est pas altéré.

En revanche, rien ne nous indique que la localisation de ces cassures n'est pas perturbée. Divers arguments nous laissent penser que la présence de 8-OdG pourrait perturber le positionnement des CBD. Tout d'abord, la liaison de SPO11 nécessite une chromatine ouverte, qui est normalement médiée par PRDM9. La présence de 8OdG induit de fait, une ouverture chromatinienne, en particulier par le biais de sa machinerie de réparation, ce qui pourrait attirer SPO11. A l'inverse, la présence de la 8OdG ou de divers acteurs impliqués dans sa réparation pourraient perturber la fixation de SPO11 comme c'est le cas pour différents acteurs protéiques de la transcription (Hailer-Morrison et al., 2003; Pastukh et al., 2015). En outre, la délimitation des points chauds de recombinaison méiotiques se fait par l'activité méthyltransférase de PRDM9 au niveau des queues des histones (Kang et al., 2018). Un des partenaires de PRDM9 est, de son côté, responsable de l'enrichissement des sites PRDM9 en 5hmC (Y. Imai et al., 2020). La 8OdG et OGG1 étant capables d'interagir ou de perturber l'activité de multiples enzymes chargées de la méthylation, aussi bien au niveau de l'ADN que des histones (Gorini et al., 2021; Maltseva et al., 2009; X. Zhou et al., 2016), il paraît envisageable que leur présence altère la localisation des sites de recombinaison. Ces hypothèses sont particulièrement vraies si les 8OdG sont présentes dans la cellule méiotique, ce qui est fortement probable après exposition adulte au KBrO₃. Néanmoins, rien ne nous garantit que ce n'est pas le cas pour les expositions fœtales ou néonatales (nous en reparlerons un peu plus tard). En fonction de la présence ou non de la 8OdG, les mécanismes d'altérations méiotiques pourraient donc être différents. Indépendamment de la présence de 8OdG au moment de la méiose, sa survenue à un moment de la vie de la cellule germinale a pu provoquer des modifications du paysage épigénétique, modifications qui peuvent, elles, être encore présentes au moment de la méiose. Des défauts de la méthylation de l'ADN sont également tenus pour responsables d'altérations méiotiques, en particulier à cause de la dérégulation des éléments transposables. Zamudio *et al.* décrivent aussi la formation de cassures abusives dépendantes de SPO11 dans les cellules méiotiques invalidées pour *Dnmt3l* (Zamudio et al., 2015). Pour vérifier que la localisation des CDB n'est pas altérée, nous souhaiterions réaliser un ChIP-Seq dirigé contre SPO11 ou PRDM9.

Curieusement, les souris *Ogg1*^{-/-} exposées en vie néonatale présentent un nombre de foyers MLH1 nettement diminué au stade pachytène alors qu'elles possèdent presque autant de

spermatocytes avec des défauts de recombinaison homologue que les souris *Ogg1*^{-/-} exposées en vie foetale. Cette constatation ayant été faite par immunofluorescence, nous ne savons pas si l'absence de MLH1 au niveau de la chromatine est due à des altérations transcriptionnelles, traductionnelles, ou si la protéine est présente mais incapable de se fixer (absence d'un partenaire ? impossibilité de se fixer car protéine tronquée ? ...). Une quantification de l'ARNm de MLH1 par PCR ou une détection de sa protéine par *Western Blot* dans des spermatocytes triés au stade pachytène pourrait être faite en première intention afin de déterminer quel « état » de MLH1 est perturbé. Encore une fois, une désorganisation du paysage épigénétique pourrait être impliqué car le promoteur de MLH1 présente une grande susceptibilité et son expression est souvent perturbée par une méthylation aberrante dans le cadre de cancers (Cunningham et al., 1998). Dans tous les cas, la diminution du nombre de foyer MLH1 est révélatrice d'un défaut de formation des *crossing-over* et, par conséquent, des chiasmas, liens indispensables pour une ségrégation correcte en métaphase (S. Wang et al., 2017). Nous observons effectivement une augmentation du nombre de cellules métaphasiques présentant au moins un bivalent non apparié après exposition au bromate de potassium. Ceci peut conduire à la formation de gamètes aneuploïdes ou à une mortalité des cellules germinales au moment du point de contrôle métaphase-anaphase (Nagaoka et al., 2012), conduisant dans tous les cas à des altérations de la fertilité.

Étant donné les nombreuses altérations observées chez le mâle OGG, nous avons réalisé des tests de fertilité. Nous observons une diminution de 20% du nombre de petits cumulus sur 12 portées ainsi qu'un allongement de la latence entre deux portées chez les mâles déficients pour OGG1 exposés en vie néonatale au KBrO₃. De manière surprenante, nous observons une fertilité presque autant réduite chez le mâle sauvage exposé en vie néonatale sans pour autant observer de cellules apoptotiques ou d'altérations du nombre de cellules au stade pachytène. Par contre, ces individus présentent, comme les *Ogg1*^{-/-}, une diminution drastique du nombre de CSS. Ainsi, indépendamment de la voie de réparation, l'établissement des cellules souches spermatogoniales en période néonatale semble présenter une grande sensibilité aux dommages oxydatifs de l'ADN. Les tests de fertilité étant des expériences longues, relativement coûteuses et pouvant soulever quelques questions éthiques, nous nous sommes concentrés sur les animaux exposés en vie néonatale car ils présentent des altérations plus drastiques dans l'ensemble. Toutefois, les animaux exposés en vie foetale présentant une diminution du nombre de CSS similaire à celle observée après exposition néonatale, nous pouvons supposer que leur fertilité soit autant altérée.

Même si les effets des dommages oxydatifs au niveau des cellules germinales sont indéniables, la fertilité des individus repose également sur des interactions entre les cellules germinales et les cellules somatiques. Une régulation fine au niveau endocrine et paracrine est strictement nécessaire

au bon déroulement de la spermatogenèse (Pour revue, Sofikitis et al., 2008). Dans notre modèle, la délétion d'*Ogg1* concerne l'animal dans son entièreté, tout comme l'exposition au KBrO₃ par voie orale. On ne peut donc pas exclure que les cellules somatiques testiculaires comme les organes endocrines aient eux aussi subi l'oxydation. Des observations histologiques en fin d'exposition et à l'âge adulte nous laissent penser que les cellules somatiques testiculaires, en particulier les cellules de Sertoli, ne sont pas altérées. De même, les animaux exposés, déficients ou non pour OGG1, vivent longtemps, jusqu'à près de deux ans, sans tumorigenèse évidente. Il serait pour autant intéressant de caractériser les taux sériques d'hormones stéroïdes et de développer l'étude des populations somatiques. Le séquençage sur cellules uniques initié afin d'observer l'orientation des cellules germinales en fin d'exposition néonatale sera réalisé à partir de testicules entiers. Nous pourrions donc nous intéresser également aux dérégulations des différentes populations somatiques testiculaires.

Et maintenant ?

Une des questions majeures qui reste encore en suspens est : Les lésions oxydatives de l'ADN sont-elles toujours présentes chez l'animal adulte ? Si non, quelle(s) cicatrice(s) ont-elles laissé pour engendrer de tels défauts à long-terme ? Il est donc primordial de réaliser rapidement une cartographie des dommages oxydatifs de l'ADN dans les cellules germinales, dès la fin de l'exposition, mais aussi à l'âge adulte, par exemple grâce à la méthode d'OXIDIP-Seq (Amente et al., 2019; Gorini et al., 2022). Au-delà de la constatation de leur maintien ou de leur disparition, nous pourrions évaluer s'il existe des points chauds d'oxydation dans les cellules germinales.

Ces résultats pourront être mis en perspective avec le polymorphisme nucléotidique que nous observons par séquençage sur génome entier. En effet, indépendamment du génotype, nous observons la survenue d'anomalies développementales de la face dans la descendance des mâles exposés en vie néonatale au KBrO₃. La 8OdG est connue pour être un dommage mutagène (Cheng et al., 1992) mais la survenue récurrente d'anomalies, semblables entre les individus, dans la descendance de plusieurs mâles exposés nous laisse penser que des mutations systématiques apparaissent et que certaines régions du génome sont davantage touchées. Une collaboration avec l'Institut Imagine est également en cours afin de déterminer si la cause de ces défauts est unique et, si oui, quelle mutation en est responsable.

Comme évoqué précédemment, la différenciation germinale repose sur l'expression successive de programmes transcriptionnels précis et la 8OdG peut perturber la transcription par de multiples biais. De plus, nous avons observé chez la souris femelle avec le BADGE et le BPAF comme avec le mélange BPA/DEHP dans les testicules fœtaux humains de multiples dérégulations du transcriptome suite à une exposition à ces PE. Nous souhaitons donc évaluer les altérations

transcriptionnelles dans les cellules germinales après survenue de dommages oxydatifs de l'ADN par RNA-Seq. De même, l'environnement épigénétique et en particulier la méthylation de l'ADN sont intimement liés à la différenciation germinale et à l'oxydation (Menezo et al., 2016). Nous observons effectivement une hypométhylation globale dans les cellules germinales humaines après exposition au BPA/DEHP. Ainsi, nous souhaitons étudier les dérégulations de la méthylation de l'ADN après survenue de dommages oxydatifs de l'ADN par séquençage Nanopore. Cette technique nous permettra de nous abroger de l'amplification par PCR et de la conversion bisulfite et de distinguer 5mC et 5hmC.

La collecte des cellules germinales et la purification ADN/ARN pour réaliser ces différentes analyses omiques sont presque finalisées. Afin de démêler au mieux les mécanismes sous-jacents, il faudrait réaliser l'ensemble de ces explorations au moment de l'établissement des CSS en vie néonatale et au moment de la méiose, à l'âge adulte.

En dehors de l'accumulation de connaissances fondamentales, la compréhension des mécanismes dans le modèle murin a pour objectif de décrypter ce qu'il se passe chez l'Homme afin de prévenir voire soigner les infertilités et les cancers testiculaires, en constantes augmentations. Il est donc primordial d'essayer de comprendre si les effets sur les cellules germinales humaines et murines sont similaires. Pour cela, nous possédons un modèle au laboratoire qui a déjà fait ses preuves. Comme évoqué précédemment, nous avons exposé des testicules fœtaux humains au KBrO3 et nous observons, comme constaté dans l'ovaire fœtal après exposition à divers PE, une augmentation du nombre de cellules indifférenciées au détriment des cellules différenciées. Ceci semble être le signe d'altérations de la différenciation des cellules germinales suite à la survenue de dommages oxydatifs de l'ADN, pouvant conduire à des altérations de fertilité et à la survenue de cancers testiculaires.

Toutefois, l'observation d'un défaut de différenciation dans le testicule fœtal humain après survenue de dommages oxydatifs de l'ADN reste vraiment insuffisante pour une compréhension globale des évènements. Afin de caractériser les altérations cellulaires et transcriptionnelles causées par les dommages oxydatifs dans les cellules germinales humaines, nous proposons de réaliser une analyse transcriptomique spatiale par hybridation *in situ* sur cellule unique (*Multiplexed Error-Robust Fluorescence in situ Hybridization* MERFISH). L'inconvénient majoritaire de l'étude des gonades fœtales humaines est la quantité de matériel à disposition. Ainsi, le MERFISH présente plusieurs avantages : il nous permettra 1/ d'évaluer de manière exhaustive la différenciation des cellules germinales, en distinguant l'ensemble des populations germinales et 2/ de mettre en évidence la localisation des cellules germinales et somatiques et tenter de comprendre leurs interactions qui sont essentielles dans la différenciation des cellules germinales. La collecte des greffons exposés au bromate de potassium nécessaire à ces analyses est en cours de finalisation.

Conclusion

En conclusion, ce projet de thèse s'inscrit tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué. Nous avons pu montrer, d'une part, le rôle des dommages oxydatifs de l'ADN sur la différenciation germinale mâle et femelle, au moment de leur survenue et à long-terme. De l'autre, nous avons décrit l'impact de certains polluants environnementaux à action pro-oxydante sur la lignée germinale murine et humaine et sur la fertilité. Nous observons une signature commune des défauts et proposons, au regard de l'ensemble de ces travaux, que les dommages oxydatifs de l'ADN puissent être un des chaînons manquants tant recherchés entre polluants environnementaux et infertilité. Les analyses omiques en cours nous permettront sans doute de comprendre plus précisément le mécanisme d'action.

Annexe

First experimental evidence of the impact of endocrine disrupting compounds on testicular cancer in humans.

Authors:

Nour Nicolas^a, Delphine Moison^a, Amandine Jampy^a, Quentin Masson^a, Nathalie Dechamps^b, Sébastien Messiaen^a, Sonia Abdallah^a, Stéphanie Pozzi-Gaudin^c, Alexandra Benachi^c, Damien Ulveling^d, Claire Francastel^d, Virginie Rouiller-Fabre^a, Gabriel Livera^{a*}, Marie-Justine Guerquin^{a*}

* authors contributed to the manuscript equally

† correspondence: marie-justine.guerquin@cea.fr

Affiliations:

^a Université Paris-Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, Fontenay aux Roses, France; Université de Paris-Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, Fontenay aux Roses, France; Laboratory of the Development of the Gonads, France.

^b Université Paris-Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, Fontenay aux Roses, France; Université de Paris-Cité, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Institut de Biologie François Jacob, 92260, France.

^c Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital A. Bécclère, Université Paris Sud, Clamart, France

^dUMR7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, CNRS, Université Paris Cité, F-75013 Paris, France

Keywords: *Testicular cancer, Environmental endocrine disruptor, Germ cell, Male reproductive health, Human testis, DEHP, BPA.*

ABSTRACT

Testicular cancer is an increasing burden in modern societies and the most common malignancy among young adult males. Environment contaminants, especially endocrine disruptors (EED), may play a significant role in the development of these cancers through epigenetic alterations occurring during fetal and neonatal development. As long-term studies in humans and suitable experimental models with the potential to develop testicular cancer are lacking, no causal link can be established between endocrine disruptor exposure and testicular cancer incidence. Therefore, we developed an experimental model that recapitulates the differentiation of germ cells from primordial germ cells (pluripotency) into spermatocytes (meiosis) by using xenografted human fetal testis combined with germ cell transplantation into adult testis compartments. Using this model, we demonstrate that long-term fetal exposure (until 12 weeks) to a mixture of phthalates (Di-2-ethylhexylphthalate, DEHP) and bisphenol (Bisphenol A, BPA), the most prevalent plasticizers, could interfere with fetal germ cell differentiation, leading to carcinogenesis and seminomas. At the end of BPA/DEHP exposure, transcriptome, methylome, and histological analyses reveal that some significant hallmarks of germ cell tumors occur: persistent pluripotent and proliferative germ cells, global hypomethylation of CpGs in germ cells, abnormal expression of meiotic markers and fibrotic signatures in fetal testis. Additionally, we found that EED-exposed fetal germ cells were more likely to develop seminoma in a context that allows spermatogenesis to begin. In the present study, we demonstrate for the first time that EED exposure in fetal germ cells can result in long-term, irreversible lesions that can lead to tumorigenesis during the prepubescent phase.

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

*Élément sous droit,
diffusion non autorisée.*

Bibliographie

Bibliographie

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10, RA141-147.
- Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P.G., Charlton, H.M., 2000. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141, 1795–1803. <https://doi.org/10.1210/endo.141.5.7456>
- Aftabsavad, S., Noormohammadi, Z., Moini, A., Karimipoor, M., 2021. Effect of bisphenol A on alterations of ICAM-1 and HLA-G genes expression and DNA methylation profiles in cumulus cells of infertile women with poor response to ovarian stimulation. *Sci Rep* 11, 9595. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87175-1>
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A., Gupta, S., 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10, 49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Ahmad, M.K., Amani, S., Mahmood, R., 2014. Potassium bromate causes cell lysis and induces oxidative stress in human erythrocytes. *Environ Toxicol* 29, 138–145. <https://doi.org/10.1002/tox.20780>
- Aitken, R.J., 2020. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 159, R189–R201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
- Albamonte, M.S., Willis, M.A., Albamonte, M.I., Jensen, F., Espinosa, M.B., Vitullo, A.D., 2008. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Hum Reprod* 23, 1895–1901. <https://doi.org/10.1093/humrep/den197>
- Albert, O., Jégou, B., 2014. A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update* 20, 231–249. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt050>
- Ali, S., Steinmetz, G., Montillet, G., Perrard, M.-H., Loundou, A., Durand, P., Guichaoua, M.-R., Prat, O., 2014. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* 9, e106245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106245>
- Allard, P., Colaiácovo, M.P., 2010. Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20405–20410. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010386107>
- Allgayer, J., Kitsera, N., Bartelt, S., Epe, B., Khobta, A., 2016. Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res* 44, 7267–7280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw473>
- Almstrup, K., Høei-Hansen, C.E., Wirkner, U., Blake, J., Schwager, C., Ansgaard, W., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., 2004. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 64, 4736–4743. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0679>
- Amann, R.P., 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 29, 469–487. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655>
- Amente, S., Bertoni, A., Morano, A., Lania, L., Avvedimento, E.V., Majello, B., 2010. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene* 29, 3691–3702. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.120>
- Amente, S., Di Palo, G., Scala, G., Castrignanò, T., Gorini, F., Coccozza, S., Moresano, A., Pucci, P., Ma, B., Stepanov, I., Lania, L., Pelicci, P.G., Dellino, G.I., Majello, B., 2019. Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated

- damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 47, 221–236. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1152>
- An, J., Yin, M., Yin, J., Wu, S., Selby, C.P., Yang, Y., Sancar, A., Xu, G.-L., Qian, M., Hu, J., 2021. Genome-wide analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine at single-nucleotide resolution unveils reduced occurrence of oxidative damage at G-quadruplex sites. *Nucleic Acids Res* 49, 12252–12267. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1022>
- Anderson, R., Copeland, T.K., Schöler, H., Heasman, J., Wylie, C., 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 91, 61–68. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00271-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00271-3)
- Anderson, R.A., Telfer, E.E., 2018. Being a good egg in the 21st century. *Br Med Bull* 127, 83–89. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldy023>
- Anene-Nzelu, C.G., Li, P.Y., Luu, T.D.A., Ng, S.L., Tiang, Z., Pan, B., Tan, W.L.W., Ackers-Johnson, M., Chen, C.K., Lim, Y.P., Qin, R.W.M., Chua, W.W., Yi, L.X., Foo, R.S.-Y., Nakabeppu, Y., 2022. 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) Deficiency Exacerbates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 9180267. <https://doi.org/10.1155/2022/9180267>
- Antoniali, G., Lirussi, L., D'Ambrosio, C., Dal Piaz, F., Vascotto, C., Casarano, E., Marasco, D., Scaloni, A., Fogolari, F., Tell, G., 2014. SIRT1 gene expression upon genotoxic damage is regulated by APE1 through nCaRE-promoter elements. *Mol Biol Cell* 25, 532–547. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-05-0286>
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Arafa, H.M.M., Aly, H. a. A., Abd-Ellah, M.F., El-Refaey, H.M., 2009. Hesperidin attenuates benzo[alpha] pyrene-induced testicular toxicity in rats via regulation of oxidant/antioxidant balance. *Toxicol Ind Health* 25, 417–427. <https://doi.org/10.1177/0748233709106624>
- Arai, T., Kelly, V.P., Komoro, K., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S., 2003. Cell proliferation in liver of Mmh/Ogg1-deficient mice enhances mutation frequency because of the presence of 8-hydroxyguanine in DNA. *Cancer Res* 63, 4287–4292.
- Arai, T., Kelly, V.P., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S., 2006. The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology* 221, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.004>
- Arai, T., Kelly, V.P., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S., 2002. High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in Mmh/Ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress. *Carcinogenesis* 23, 2005–2010. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.12.2005>
- Arand, J., Wossidlo, M., Lepikhov, K., Peat, J.R., Reik, W., Walter, J., 2015. Selective impairment of methylation maintenance is the major cause of DNA methylation reprogramming in the early embryo. *Epigenetics Chromatin* 8, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-8-1>
- Arzuaga, X., Smith, M.T., Gibbons, C.F., Skakkebaek, N.E., Yost, E.E., Beverly, B.E.J., Hotchkiss, A.K., Hauser, R., Pagani, R.L., Schrader, S.M., Zeise, L., Prins, G.S., 2019. Proposed Key Characteristics of Male Reproductive Toxicants as an Approach for Organizing and Evaluating Mechanistic Evidence in Human Health Hazard Assessments. *Environ Health Perspect* 127, 65001. <https://doi.org/10.1289/EHP5045>
- Ba, X., Bacci, A., Luo, J., Aguilera-Aguirre, L., Zeng, X., Radak, Z., Brasier, A.R., Boldogh, I., 2014. 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors. *J Immunol* 192, 2384–2394. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302472>
- Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.-C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., Page, D.C., 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 38, 1430–1434. <https://doi.org/10.1038/ng1919>

- Banda, D.M., Nuñez, N.N., Burnside, M.A., Bradshaw, K.M., David, S.S., 2017. Repair of 8-oxoG:A mismatches by the MUTYH glycosylase: Mechanism, metals and medicine. *Free Radic Biol Med* 107, 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.008>
- Barati, E., Nikzad, H., Karimian, M., 2020. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci* 77, 93–113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
- Basciani, S., De Luca, G., Dolci, S., Brama, M., Arizzi, M., Mariani, S., Rosano, G., Spera, G., Gnessi, L., 2008. Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 149, 6226–6235. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0349>
- Basu, S., Je, G., Kim, Y.-S., 2015. Transcriptional mutagenesis by 8-oxodG in α -synuclein aggregation and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 47, e179. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.54>
- Baudat, F., Imai, Y., de Massy, B., 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 14, 794–806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>
- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., Forterre, P., 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414–417. <https://doi.org/10.1038/386414a0>
- Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. World Health Organization.
- Berthelsen, J.G., Skakkebaek, N.E., 1983. Gonadal function in men with testis cancer. *Fertil Steril* 39, 68–75.
- Bielskutė, S., Plavec, J., Podbevšek, P., 2021. Oxidative lesions modulate G-quadruplex stability and structure in the human BCL2 promoter. *Nucleic Acids Res* 49, 2346–2356. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab057>
- Bilancio, A., Bontempo, P., Di Donato, M., Conte, M., Giovannelli, P., Altucci, L., Migliaccio, A., Castoria, G., 2017. Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. *Oncotarget* 8, 115620–115631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23360>
- Birk, O.S., Casiano, D.E., Wassif, C.A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J.A., Parker, K.L., Porter, F.D., Westphal, H., 2000. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403, 909–913. <https://doi.org/10.1038/35002622>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., Dada, R., 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol* 14, 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Bolcun-Filas, E., Handel, M.A., 2018. Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biol Reprod* 99, 112–126. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y021>
- Bolcun-Filas, E., Schimenti, J.C., 2012. Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev Cell Mol Biol* 298, 179–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5>
- Bourc'his, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature02886>
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., Bestor, T.H., 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539. <https://doi.org/10.1126/science.1065848>
- Bourdat, G., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Cadet, J., 2000. Tandem Base Lesions Are Generated by Hydroxyl Radical within Isolated DNA in Aerated Aqueous Solution | Journal of the American Chemical Society. *Journal of the American Chemical Society* 122, 4549–4556.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Box, H.C., Dawidzik, J.B., Budzinski, E.E., 2001. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med* 31, 856–868. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00653-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00653-0)

- Branco, M.R., King, M., Perez-Garcia, V., Bogutz, A.B., Caley, M., Fineberg, E., Lefebvre, L., Cook, S.J., Dean, W., Hemberger, M., Reik, W., 2016. Maternal DNA Methylation Regulates Early Trophoblast Development. *Dev Cell* 36, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.027>
- Brégeon, D., Doddridge, Z.A., You, H.J., Weiss, B., Doetsch, P.W., 2003. Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 12, 959–970. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00360-5)
- Brégeon, D., Doetsch, P.W., 2011. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat Rev Cancer* 11, 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrc3006>
- Brégeon, D., Peignon, P.-A., Sarasin, A., 2009. Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. *PLoS Genet* 5, e1000577. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000577>
- Brennan, J., Capel, B., 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5, 509–521. <https://doi.org/10.1038/nrg1381>
- Brieno-Enríquez, M.A., Reig-Viader, R., Cabero, L., Toran, N., Martínez, F., Roig, I., Garcia Caldés, M., 2012. Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Mol Hum Reprod* 18, 171–183. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar074>
- Bristol-Gould, S.K., Kreeger, P.K., Selkirk, C.G., Kilen, S.M., Mayo, K.E., Shea, L.D., Woodruff, T.K., 2006. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol* 298, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.023>
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., Braun, R.E., 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 36, 647–652. <https://doi.org/10.1038/ng1366>
- Buck Louis, G.M., Sundaram, R., Sweeney, A.M., Schisterman, E.F., Maisog, J., Kannan, K., 2014. Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study. *Fertil Steril* 101, 1359–1366. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.022>
- Budworth, H., Dianova, I.I., Podust, V.N., Dianov, G.L., 2002. Repair of clustered DNA lesions. Sequence-specific inhibition of long-patch base excision repair by 8-oxoguanine. *J Biol Chem* 277, 21300–21305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201918200>
- Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M.A., 2009. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 10, 207–216. <https://doi.org/10.1038/nrg2505>
- Caldecott, K.W., 2020. Mammalian DNA base excision repair: Dancing in the moonlight. *DNA Repair (Amst)* 93, 102921. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102921>
- Carballo, J.A., Panizza, S., Serrentino, M.E., Johnson, A.L., Geymonat, M., Borde, V., Klein, F., Cha, R.S., 2013. Budding yeast ATM/ATR control meiotic double-strand break (DSB) levels by down-regulating Rec114, an essential component of the DSB-machinery. *PLoS Genet* 9, e1003545. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003545>
- Carraro, E., Schilirò, T., Biorci, F., Romanazzi, V., Degan, R., Buonocore, D., Verri, M., Dossena, M., Bonetta, S., Gilli, G., 2018. Physical Activity, Lifestyle Factors and Oxidative Stress in Middle Age Healthy Subjects. *Int J Environ Res Public Health* 15, 1152. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061152>
- Carrera, P., Johnstone, O., Nakamura, A., Casanova, J., Jäckle, H., Lasko, P., 2000. VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol Cell* 5, 181–187. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80414-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80414-1)
- Caserta, D., Ciardo, F., Bordi, G., Guerranti, C., Fanello, E., Perra, G., Borghini, F., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Marci, R., Lo Monte, G., Soave, I., Focardi, S., Mantovani, A., Moscarini, M., 2013. Correlation of endocrine disrupting chemicals serum levels and white blood cells gene expression of nuclear receptors in a population of infertile women. *Int J Endocrinol* 2013, 510703. <https://doi.org/10.1155/2013/510703>

- Chang, W.-H., Herianto, S., Lee, C.-C., Hung, H., Chen, H.-L., 2021. The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Sci Total Environ* 786, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>
- Chassot, A.-A., Le Rolle, M., Jolivet, G., Stevant, I., Guignonis, J.-M., Da Silva, F., Nef, S., Pailhoux, E., Schedl, A., Ghyselinck, N.B., Chaboissier, M.-C., 2020. Retinoic acid synthesis by ALDH1A proteins is dispensable for meiosis initiation in the mouse fetal ovary. *Sci Adv* 6, eaaz1261. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1261>
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., Chaboissier, M.-C., 2008. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17, 1264–1277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn016>
- Chen, D., Sun, N., Hou, L., Kim, R., Faith, J., Aslanyan, M., Tao, Y., Zheng, Y., Fu, J., Liu, W., Kellis, M., Clark, A., 2019. Human Primordial Germ Cells Are Specified from Lineage-Primed Progenitors. *Cell Rep* 29, 4568-4582.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.083>
- Chen, S.-R., Tang, J.-X., Cheng, J.-M., Li, J., Jin, C., Li, X.-Y., Deng, S.-L., Zhang, Y., Wang, X.-X., Liu, Y.-X., 2015. Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling. *Oncotarget* 6, 37012–37027. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6115>
- Cheng, K., Chen, I.-C., Cheng, C.-H.E., Mutoji, K., Hale, B.J., Hermann, B.P., Geyer, C.B., Oatley, J.M., McCarrey, J.R., 2020. Unique Epigenetic Programming Distinguishes Regenerative Spermatogonial Stem Cells in the Developing Mouse Testis. *iScience* 23, 101596. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101596>
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L.A., 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem* 267, 166–172.
- Chianese, R., Viggiano, A., Urbanek, K., Cappetta, D., Troisi, J., Scafuro, M., Guida, M., Esposito, G., Ciuffreda, L.P., Rossi, F., Berrino, L., Fasano, S., Pierantoni, R., De Angelis, A., Meccariello, R., 2018. Chronic exposure to low dose of bisphenol A impacts on the first round of spermatogenesis via SIRT1 modulation. *Sci Rep* 8, 2961. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21076-8>
- Chipman, J.K., Davies, J.E., Parsons, J.L., Nair, J., O'Neill, G., Fawell, J.K., 1998. DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation? *Toxicology* 126, 93–102. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00174-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00174-1)
- Chodavarapu, R.K., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., Hetzel, J.A., Kuo, F., Kim, J., Cokus, S.J., Casero, D., Bernal, M., Huijser, P., Clark, A.T., Krämer, U., Merchant, S.S., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* 466, 388–392. <https://doi.org/10.1038/nature09147>
- Choi, S., Choi, H.-H., Lee, S.-H., Ko, S.-H., You, H.-J., Ye, S.-K., Chung, M.-H., 2007. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine on lipopolysaccharide-induced inflammation via Rac suppression in Balb/c mice. *Free Radic Biol Med* 43, 1594–1603. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.022>
- Chuma, S., Nakatsuji, N., 2001. Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol* 229, 468–479. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9989>
- Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52, 198–236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>
- Clermont, Y., Leblond, C.P., 1959. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am J Anat* 104, 237–273. <https://doi.org/10.1002/aja.1001040204>

- Cogoi, S., Ferino, A., Miglietta, G., Pedersen, E.B., Xodo, L.E., 2018. The regulatory G4 motif of the Kirsten ras (KRAS) gene is sensitive to guanine oxidation: implications on transcription. *Nucleic Acids Res* 46, 661–676. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1142>
- Cogoi, S., Shchekotikhin, A.E., Xodo, L.E., 2014. HRAS is silenced by two neighboring G-quadruplexes and activated by MAZ, a zinc-finger transcription factor with DNA unfolding property. *Nucleic Acids Res* 42, 8379–8388. <https://doi.org/10.1093/nar/gku574>
- Cohen, P.E., Pollack, S.E., Pollard, J.W., 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27, 398–426. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0017>
- Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E., Bignami, M., 2002. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 12, 912–918. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00863-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00863-1)
- Coluzzi, E., Leone, S., Sgura, A., 2019. Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Senescence by Replication Fork Arrest. *Cells* 8, 19. <https://doi.org/10.3390/cells8010019>
- Colvin, J.S., Green, R.P., Schmahl, J., Capel, B., Ornitz, D.M., 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875–889. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00284-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00284-7)
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17, 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cooper, T.J., Wardell, K., Garcia, V., Neale, M.J., 2014. Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR. *Exp Cell Res* 329, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.016>
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi, M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L., Bellacosa, A., 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.020>
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolfi, P.P., 2004. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36, 653–659. <https://doi.org/10.1038/ng1367>
- Cree, S.L., Fredericks, R., Miller, A., Pearce, F.G., Filichev, V., Fee, C., Kennedy, M.A., 2016. DNA G-quadruplexes show strong interaction with DNA methyltransferases in vitro. *FEBS Lett* 590, 2870–2883. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12331>
- Culty, M., 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87, 1–26. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20142>
- Cunningham, J.M., Christensen, E.R., Tester, D.J., Kim, C.Y., Roche, P.C., Burgart, L.J., Thibodeau, S.N., 1998. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 58, 3455–3460.
- Danjou, A.M.N., Pérol, O., Coste, A., Faure, E., Béranger, R., Boyle, H., Belladame, E., Grassot, L., Dubuis, M., Spinosi, J., Bouaoun, L., Fléchon, A., Bujan, L., Drouineaud, V., Eustache, F., Berthaut, I., Perrin, J., Brugnon, F., Charbotel, B., Schüz, J., Fervers, B., TESTIS study group, 2021. Domestic use of pesticides during early periods of development and risk of testicular germ cell tumors in adulthood: a French nationwide case-control study. *Environ Health* 20, 111. <https://doi.org/10.1186/s12940-021-00795-y>
- David-Cordonnier, M.H., Boiteux, S., O'Neill, P., 2001. Excision of 8-oxoguanine within clustered damage by the yeast OGG1 protein. *Nucleic Acids Res* 29, 1107–1113. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.1107>

- De Felici, M., Scaldaferrri, M.L., Lobascio, M., Iona, S., Nazzicone, V., Klinger, F.G., Farini, D., 2004. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Hum Reprod Update* 10, 197–206. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh020>
- De Pol, A., Vaccina, F., Forabosco, A., Cavazzuti, E., Marzona, L., 1997. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 12, 2235–2241. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.10.2235>
- DeAngelo, A.B., George, M.H., Kilburn, S.R., Moore, T.M., Wolf, D.C., 1998. Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. *Toxicol Pathol* 26, 587–594. <https://doi.org/10.1177/019262339802600501>
- Delfosse, V., Grimaldi, M., le Maire, A., Bourguet, W., Balaguer, P., 2014. Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues. *Vitam Horm* 94, 229–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00009-2>
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J.-L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W., Balaguer, P., 2012. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14930–14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203574109>
- Dewailly, D., Robin, G., Peigne, M., Decanter, C., Pigny, P., Catteau-Jonard, S., 2016. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update* 22, 709–724. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw027>
- Ding, Q., Dimayuga, E., Keller, J.N., 2007. Oxidative stress alters neuronal RNA- and protein-synthesis: Implications for neural viability. *Free Radic Res* 41, 903–910. <https://doi.org/10.1080/10715760701416996>
- Ding, Q., Dimayuga, E., Markesbery, W.R., Keller, J.N., 2004. Proteasome inhibition increases DNA and RNA oxidation in astrocyte and neuron cultures. *J Neurochem* 91, 1211–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02802.x>
- Ding, Y., Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2017. Sequencing the Mouse Genome for the Oxidatively Modified Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. *J Am Chem Soc* 139, 2569–2572. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b12604>
- DiTroia, S.P., Percharde, M., Guerquin, M.-J., Wall, E., Collignon, E., Ebata, K.T., Mesh, K., Mahesula, S., Agathocleous, M., Laird, D.J., Livera, G., Ramalho-Santos, M., 2019. Maternal vitamin C regulates reprogramming of DNA methylation and germline development. *Nature* 573, 271–275. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1536-1>
- Dodds, E.C., Lawson, W., 1936. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* 137, 996–996. <https://doi.org/10.1038/137996a0>
- Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Rahman, I., Faux, S.P., Brown, D.M., MacNee, W., 2003. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* 34, 1369–1382. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00150-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00150-3)
- Dong, J., Wang, X., Cao, C., Wen, Y., Sakashita, A., Chen, S., Zhang, J., Zhang, Y., Zhou, L., Luo, M., Liu, M., Liao, A., Namekawa, S.H., Yuan, S., 2019. UHRF1 suppresses retrotransposons and cooperates with PRMT5 and PIWI proteins in male germ cells. *Nat Commun* 10, 4705. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12455-4>
- Doshi, T., Mehta, S.S., Dighe, V., Balasinor, N., Vanage, G., 2011. Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology* 289, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Du, G., Oatley, M.J., Law, N.C., Robbins, C., Wu, X., Oatley, J.M., 2021. Proper timing of a quiescence period in precursor prospermatogonia is required for stem cell pool establishment in the male germline. *Development* 148, dev194571. <https://doi.org/10.1242/dev.194571>

- Dura, M., Teissandier, A., Armand, M., Barau, J., Lapoujade, C., Fouchet, P., Bonneville, L., Schulz, M., Weber, M., Baudrin, L.G., Lameiras, S., Bourc'his, D., 2022. DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis. *Nat Genet* 54, 469–480. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01040-z>
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 30, 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Eladak, S., Moison, D., Guerquin, M.-J., Matilionyte, G., Kilcoyne, K., N'Tumba-Byn, T., Messiaen, S., Deceuninck, Y., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Antignac, J.-P., Mitchell, R., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2018. Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS One* 13, e0191934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191934>
- Elsheikh, A.S., Fadul, T.F., Aboagla, E.M.-E., Rahim Gameel, A.A., 2016. Effects of potassium bromate on male rat growth and testicular histology. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5, 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.001>
- Epe, B., 2002. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383, 467–475. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.049>
- Epe, B., 1996. DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127, 223–249. <https://doi.org/10.1007/BFb0048268>
- Faja, F., Esteves, S., Pallotti, F., Cicolani, G., Di Chiano, S., Delli Paoli, E., Lenzi, A., Lombardo, F., Paoli, D., 2022. Environmental disruptors and testicular cancer. *Endocrine* 78, 429–435. <https://doi.org/10.1007/s12020-022-03171-z>
- Fakhro, K.A., Elbardisi, H., Arafa, M., Robay, A., Rodriguez-Flores, J.L., Al-Shakaki, A., Syed, N., Mezey, J.G., Abi Khalil, C., Malek, J.A., Al-Ansari, A., Al Said, S., Crystal, R.G., 2018. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med* 20, 1365–1373. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.10>
- Falck, F., Ricci, A., Wolff, M.S., Godbold, J., Deckers, P., 1992. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47, 143–146.
- Farini, D., De Felici, M., 2022. The Beginning of Meiosis in Mammalian Female Germ Cells: A Never-Ending Story of Intrinsic and Extrinsic Factors. *Int J Mol Sci* 23, 12571. <https://doi.org/10.3390/ijms232012571>
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique (No. L'actualité Chimique n°270).
- Fayomi, A.P., Orwig, K.E., 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res* 29, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Ferino, A., Xodo, L.E., 2021. Effect of DNA Glycosylases OGG1 and Neil1 on Oxidized G-Rich Motif in the KRAS Promoter. *Int J Mol Sci* 22, 1137. <https://doi.org/10.3390/ijms22031137>
- Fernandez, M.F., Arrebola, J.P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J.L., Olea, N., 2007. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.007>
- Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2020. Interplay of Guanine Oxidation and G-Quadruplex Folding in Gene Promoters. *J Am Chem Soc* 142, 1115–1136. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11050>
- Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2017. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: Epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis. *DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance IV* 56, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.009>
- Fleming, A.M., Ding, Y., Burrows, C.J., 2017. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 2604–2609. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619809114>
- Fleming, A.M., Zhou, J., Wallace, S.S., Burrows, C.J., 2015. A Role for the Fifth G-Track in G-Quadruplex Forming Oncogene Promoter Sequences during Oxidative Stress: Do These “Spare Tires”

- Have an Evolved Function? *ACS Cent Sci* 1, 226–233. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00202>
- Fleming, A.M., Zhu, J., Howpay Manage, S.A., Burrows, C.J., 2019. Human NEIL3 Gene Expression Regulated by Epigenetic-Like Oxidative DNA Modification. *J Am Chem Soc* 141, 11036–11049. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b01847>
- Fleming, A.M., Zhu, Judy, Ding, Y., Visser, J.A., Zhu, Julia, Burrows, C.J., 2018. Human DNA Repair Genes Possess Potential G-Quadruplex Sequences in Their Promoters and 5'-Untranslated Regions. *Biochemistry* 57, 991–1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01172>
- Frydman, N., Poulain, M., Arkoun, B., Duquenne, C., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Benachi, A., Livera, G., 2017. Human foetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. *Hum Reprod* 32, 631–642. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew343>
- Fu, Y., Niu, Y., Pan, B., Liu, Y., Zhang, B., Li, X., Yang, A., Nie, J., Wang, R., Yang, J., 2019. OGG1 methylation mediated the effects of cell cycle and oxidative DNA damage related to PAHs exposure in Chinese coke oven workers. *Chemosphere* 224, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.114>
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M., 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec* 188, 315–330. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880305>
- Fukushima, S., Yamashita, S., Kobayashi, H., Takami, H., Fukuoka, K., Nakamura, T., Yamasaki, K., Matsushita, Y., Nakamura, H., Totoki, Y., Kato, M., Suzuki, T., Mishima, K., Yanagisawa, T., Mukasa, A., Saito, N., Kanamori, M., Kumabe, T., Tominaga, T., Nagane, M., Iuchi, T., Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Tamura, K., Sakai, K., Sugiyama, K., Nakada, M., Yokogami, K., Takeshima, H., Kanemura, Y., Matsuda, M., Matsumura, A., Kurozumi, K., Ueki, K., Nonaka, M., Asai, A., Kawahara, N., Hirose, Y., Takayama, T., Nakazato, Y., Narita, Y., Shibata, T., Matsutani, M., Ushijima, T., Nishikawa, R., Ichimura, K., Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (The iGCT Consortium), 2017. Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors indicate a primordial germ cell origin for germinomas. *Acta Neuropathol* 133, 445–462. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1673-2>
- Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, H., Zhang, P., Liu, J., Feng, Y., Men, Y., Li, L., Shen, W., Sun, Z., Min, L., 2019. Pubertal exposure to low doses of zearalenone disrupting spermatogenesis through ER α related genetic and epigenetic pathways. *Toxicol Lett* 315, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.08.007>
- Gaskell, T.L., Esnal, A., Robinson, L.L.L., Anderson, R.A., Saunders, P.T.K., 2004. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 71, 2012–2021. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028381>
- Gely-Pernot, A., Hao, C., Becker, E., Stuparevic, I., Kervarrec, C., Chalmel, F., Primig, M., Jégou, B., Smagulova, F., 2015. The epigenetic processes of meiosis in male mice are broadly affected by the widely used herbicide atrazine. *BMC Genomics* 16, 885. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2095-y>
- Gely-Pernot, A., Hao, C., Legoff, L., Multigner, L., D'Cruz, S.C., Kervarrec, C., Jégou, B., Tevosian, S., Smagulova, F., 2018. Gestational exposure to chlordecone promotes transgenerational changes in the murine reproductive system of males. *Sci Rep* 8, 10274. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28670-w>
- Gely-Pernot, A., Saci, S., Kernanec, P.-Y., Hao, C., Giton, F., Kervarrec, C., Tevosian, S., Mazaud-Guittot, S., Smagulova, F., 2017. Embryonic exposure to the widely-used herbicide atrazine disrupts meiosis and normal follicle formation in female mice. *Sci Rep* 7, 3526. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03738-1>
- Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19, 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>
- Geng, P., Yao, J., Zhu, Y., 2014. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 41, 2299–2306. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3083-z>

- Georgakilas, A.G., O'Neill, P., Stewart, R.D., 2013. Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far? *Radiat Res* 180, 100–109. <https://doi.org/10.1667/RR3041.1>
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V., 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685–704. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.2>
- German, P., Saenz, D., Szaniszlo, P., Aguilera-Aguirre, L., Pan, L., Hegde, M.L., Bacsi, A., Hajas, G., Radak, Z., Ba, X., Mitra, S., Papaconstantinou, J., Boldogh, I., 2017. 8-Oxoguanine DNA glycosylase1-driven DNA repair-A paradoxical role in lung aging. *Mech Ageing Dev* 161, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.06.009>
- Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., Pietrokovski, S., Kleiman, S.E., 2017. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med* 19, 998–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.225>
- Ghafari, F., Gutierrez, C.G., Hartshorne, G.M., 2007. Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol* 7, 87. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-87>
- Ghelmani, Y., Asadian, F., Antikchi, M.H., Dastgheib, S.A., Shaker, S.H., Jafari-Nedooshan, J., Neamatzadeh, H., 2021. Association Between the hOGG1 1245C>G (rs1052133) Polymorphism and Susceptibility to Colorectal Cancer: a Meta-analysis Based on 7010 Cases and 10,674 Controls. *J Gastrointest Cancer* 52, 389–398. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00532-7>
- Gill, M.E., Hu, Y.-C., Lin, Y., Page, D.C., 2011. Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7443–7448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104501108>
- Ginsburg, M., Snow, M.H., McLaren, A., 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521–528. <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.521>
- Girard, C., Zwicker, D., Mercier, R., 2023. The regulation of meiotic crossover distribution: a coarse solution to a century-old mystery? *Biochem Soc Trans* 51, 1179–1190. <https://doi.org/10.1042/BST20221329>
- González-Sanz, S., Barreñada, O., Rial, E., Brieño-Enriquez, M.A., Del Mazo, J., 2020. The antiandrogenic vinclozolin induces differentiation delay of germ cells and changes in energy metabolism in 3D cultures of fetal ovaries. *Sci Rep* 10, 18036. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75116-3>
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 65, 7–17. <https://doi.org/10.1080/09553009414550021>
- Gorini, F., Scala, G., Ambrosio, S., Majello, B., Amente, S., 2022. OxiDIP-Seq for Genome-wide Mapping of Damaged DNA Containing 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine. *Bio Protoc* 12, e4540. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4540>
- Gorini, F., Scala, G., Cooke, M.S., Majello, B., Amente, S., 2021. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair (Amst)* 97, 103027. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103027>
- Gregoire, E.P., De Cian, M.-C., Migale, R., Perea-Gomez, A., Schaub, S., Bellido-Carreras, N., Stévant, I., Mayère, C., Neirijnck, Y., Loubat, A., Rivaud, P., Sopena, M.L., Lachambre, S., Linssen, M.M., Hohenstein, P., Lovell-Badge, R., Nef, S., Chalmel, F., Schedl, A., Chaboissier, M.-C., 2023. The -KTS splice variant of WT1 is essential for ovarian determination in mice. *Science* 382, 600–606. <https://doi.org/10.1126/science.add8831>
- Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Toporova, L., Balaguer, P., 2019. Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology* 420, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.04.003>
- Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev* 96, 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Grive, K.J., Hu, Y., Shu, E., Grimson, A., Elemento, O., Grenier, J.K., Cohen, P.E., 2019. Dynamic transcriptome profiles within spermatogonial and spermatocyte populations during

- postnatal testis maturation revealed by single-cell sequencing. *PLoS Genet* 15, e1007810. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007810>
- Gruber, D.R., Toner, J.J., Miears, H.L., Shernyukov, A.V., Kiryutin, A.S., Lomzov, A.A., Endutkin, A.V., Grin, I.R., Petrova, D.V., Kupryushkin, M.S., Yurkovskaya, A.V., Johnson, E.C., Okon, M., Bagryanskaya, E.G., Zharkov, D.O., Smirnov, S.L., 2018. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics and enzymatic demethylation. *Nucleic Acids Res* 46, 10827–10839. <https://doi.org/10.1093/nar/gky893>
- Gu, Y., Parker, A., Wilson, T.M., Bai, H., Chang, D.-Y., Lu, A.-L., 2002. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* 277, 11135–11142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108618200>
- Guo, F., Yan, L., Guo, H., Li, L., Hu, B., Zhao, Y., Yong, J., Hu, Y., Wang, X., Wei, Y., Wang, W., Li, R., Yan, J., Zhi, X., Zhang, Y., Jin, H., Zhang, W., Hou, Y., Zhu, P., Li, J., Zhang, L., Liu, S., Ren, Y., Zhu, X., Wen, L., Gao, Y.Q., Tang, F., Qiao, J., 2015. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell* 161, 1437–1452. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.015>
- Guo, J., Hanawalt, P.C., Spivak, G., 2013. Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. *Nucleic Acids Res* 41, 7700–7712. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt524>
- Guo, J., Sosa, E., Chitiashvili, T., Nie, X., Rojas, E.J., Oliver, E., DonorConnect, Plath, K., Hotaling, J.M., Stukenborg, J.-B., Clark, A.T., Cairns, B.R., 2021. Single-cell analysis of the developing human testis reveals somatic niche cell specification and fetal germline stem cell establishment. *Cell Stem Cell* 28, 764–778.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.12.004>
- Hahm, J.Y., Park, J., Jang, E.-S., Chi, S.W., 2022. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med* 54, 1626–1642. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00822-z>
- Hailer-Morrison, M.K., Kotler, J.M., Martin, B.D., Sugden, K.D., 2003. Oxidized guanine lesions as modulators of gene transcription. Altered p50 binding affinity and repair shielding by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine lesions in the NF-kappaB promoter element. *Biochemistry* 42, 9761–9770. <https://doi.org/10.1021/bi034546k>
- Han, X., Huang, Q., 2021. Environmental pollutants exposure and male reproductive toxicity: The role of epigenetic modifications. *Toxicology* 456, 152780. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152780>
- Handel, M.A., Schimenti, J.C., 2010. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11, 124–136. <https://doi.org/10.1038/nrg2723>
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortés, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., Wilson, D.I., 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91, 403–407. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00307-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00307-x)
- Hardell, L., Bavel, B., Lindström, G., Eriksson, M., Carlberg, M., 2006. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int J Androl* 29, 228–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00622.x>
- Hardell, L., van Bavel, B., Lindström, G., Carlberg, M., Dreifaldt, A.C., Wijkström, H., Starkhammar, H., Eriksson, M., Hallquist, A., Kolmert, T., 2003. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect* 111, 930–934. <https://doi.org/10.1289/ehp.5816>
- Hargan-Calvopina, J., Taylor, S., Cook, H., Hu, Z., Lee, S.A., Yen, M.-R., Chiang, Y.-S., Chen, P.-Y., Clark, A.T., 2016. Stage-Specific Demethylation in Primordial Germ Cells Safeguards against Precocious Differentiation. *Dev Cell* 39, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.019>

- Harper, J.V., Anderson, J.A., O'Neill, P., 2010. Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? *DNA Repair (Amst)* 9, 907–913. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.06.002>
- Hayashi, K., Yoshida, K., Matsui, Y., 2005. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438, 374–378. <https://doi.org/10.1038/nature04112>
- Hayashi, Y., Otsuka, K., Ebina, M., Igarashi, Kaori, Takehara, A., Matsumoto, M., Kanai, A., Igarashi, Kazuhiko, Soga, T., Matsui, Y., 2017. Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 8289–8294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620915114>
- Heaney, J.D., Anderson, E.L., Michelson, M.V., Zechel, J.L., Conrad, P.A., Page, D.C., Nadeau, J.H., 2012. Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. *Development* 139, 1577–1586. <https://doi.org/10.1242/dev.076851>
- Heindel, J.J., Skalla, L.A., Joubert, B.R., Dilworth, C.H., Gray, K.A., 2017. Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology. *Reprod Toxicol* 68, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.011>
- Hermann, B.P., Cheng, K., Singh, A., Roa-De La Cruz, L., Mutoji, K.N., Chen, I.-C., Gildersleeve, H., Lehle, J.D., Mayo, M., Westernströer, B., Law, N.C., Oatley, M.J., Velte, E.K., Niedenberger, B.A., Fritze, D., Silber, S., Geyer, C.B., Oatley, J.M., McCarrey, J.R., 2018. The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep* 25, 1650-1667.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.026>
- Hermann, B.P., Mutoji, K.N., Velte, E.K., Ko, D., Oatley, J.M., Geyer, C.B., McCarrey, J.R., 2015. Transcriptional and translational heterogeneity among neonatal mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 92, 54. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125757>
- Hilf, R., 1977. RNA: DNA ratios in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 59, 1053–1054. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.4.1053>
- Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Katoh-Fukui, Y., Kurohmaru, M., Morohashi, K.-I., Wilhelm, D., Koopman, P., Kanai, Y., 2009. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 136, 129–138. <https://doi.org/10.1242/dev.029587>
- Hiura, H., Obata, Y., Komiyama, J., Shirai, M., Kono, T., 2006. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* 11, 353–361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00943.x>
- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J.-L., Mattsson, A., Cotgreave, I.A., 2005. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biol Chem* 386, 333–337. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.040>
- Hosoya, N., Miyagawa, K., 2021. Synaptonemal complex proteins modulate the level of genome integrity in cancers. *Cancer Sci* 112, 989–996. <https://doi.org/10.1111/cas.14791>
- Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P.W., Sokol, R.Z., 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2, e1289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001289>
- Hsu, P.C., Liu, M.Y., Hsu, C.C., Chen, L.Y., Guo, Y.L., 1997. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 122, 133–143. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00090-5](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00090-5)
- Hu, Y.-C., Okumura, L.M., Page, D.C., 2013. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet* 9, e1003629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003629>
- Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F., Hassold, T.J., 2003. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13, 546–553. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00189-1)

- Hunt, P.A., Lawson, C., Gieske, M., Murdoch, B., Smith, H., Marre, A., Hassold, T., VandeVoort, C.A., 2012. Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17525–17530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207854109>
- Iguchi, T., Fukazawa, Y., Uesugi, Y., Takasugi, N., 1990. Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 43, 478–484. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.478>
- Imai, A., Hagiwara, Y., Niimi, Y., Tokumoto, T., Saga, Y., Suzuki, A., 2020. Mouse dead end1 acts with Nanos2 and Nanos3 to regulate testicular teratoma incidence. *PLoS One* 15, e0232047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232047>
- Imai, Y., Biot, M., Clément, J.A., Teragaki, M., Urbach, S., Robert, T., Baudat, F., Grey, C., de Massy, B., 2020. PRDM9 activity depends on HELLS and promotes local 5-hydroxymethylcytosine enrichment. *Elife* 9, e57117. <https://doi.org/10.7554/eLife.57117>
- Imaimatsu, K., Uchida, A., Hiramatsu, R., Kanai, Y., 2022. Gonadal Sex Differentiation and Ovarian Organogenesis along the Cortical-Medullary Axis in Mammals. *Int J Mol Sci* 23, 13373. <https://doi.org/10.3390/ijms232113373>
- Ishida, T., Takashima, R., Fukayama, M., Hamada, C., Hippo, Y., Fujii, T., Moriyama, S., Matsuba, C., Nakahori, Y., Morita, H., Yazaki, Y., Kodama, T., Nishimura, S., Aburatani, H., 1999. New DNA polymorphisms of human MMH/OGG1 gene: prevalence of one polymorphism among lung-adenocarcinoma patients in Japanese. *Int J Cancer* 80, 18–21. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990105\)80:1<18::aid-ijc4>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990105)80:1<18::aid-ijc4>3.0.co;2-e)
- Ishii, T., Hayakawa, H., Igawa, T., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., 2018. Specific binding of PCBP1 to heavily oxidized RNA to induce cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 6715–6720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806912115>
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jacobs, A.L., Schär, P., 2012. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00412-011-0347-4>
- Jałoszynski, P., Murata, S., Shinkai, Y., Takahashi, S., Kumagai, Y., Nishimura, S., Yamamoto, M., 2007. Dysfunction of Nrf2 decreases KBrO₃-induced oxidative DNA damage in Ogg1-null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 966–971. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.123>
- Jang, H.S., Shin, W.J., Lee, J.E., Do, J.T., 2017. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)* 8, 148. <https://doi.org/10.3390/genes8060148>
- Jefferson, W., Newbold, R., Padilla-Banks, E., Pepling, M., 2006. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod* 74, 161–168. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045724>
- Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., Chen, L., 2013. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J Biomed Res* 27, 135–144. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120076>
- Junge, K.M., Leppert, B., Jahreis, S., Wissenbach, D.K., Feltens, R., Grützmann, K., Thürmann, L., Bauer, T., Ishaque, N., Schick, M., Bewerunge-Hudler, M., Röder, S., Bauer, M., Schulz, A., Borte, M., Landgraf, K., Körner, A., Kiess, W., von Bergen, M., Stangl, G.I., Trump, S., Eils, R., Polte, T., Lehmann, I., 2018. MEST mediates the impact of prenatal bisphenol A exposure on long-term body weight development. *Clin Epigenetics* 10, 58. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0478-z>
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res* 93, 31–35. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(03)00062-8)
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., Saitou, M., 2013. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J* 32, 340–353. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.331>

- Takehashi, A., Ishii, N., Okuno, T., Fujioka, M., Gi, M., Wanibuchi, H., 2017. Enhanced Susceptibility of Ogg1 Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 18, 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms18081801>
- Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Morimoto, H., Chuma, S., Raducanu, A., Nakatsuji, N., Fässler, R., Shinohara, T., 2008. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* 3, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.002>
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., Sasaki, H., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429, 900–903. <https://doi.org/10.1038/nature02633>
- Kang, R., Zelazowski, M.J., Cole, F., 2018. Missing the Mark: PRDM9-Dependent Methylation Is Required for Meiotic DSB Targeting. *Mol Cell* 69, 725–727. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.021>
- Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y., Hayashi, Y., 1987. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* 8, 1959–1961. <https://doi.org/10.1093/carcin/8.12.1959>
- Kashimada, K., Koopman, P., 2010. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 137, 3921–3930. <https://doi.org/10.1242/dev.048983>
- Kashimada, K., Svingen, T., Feng, C.-W., Pelosi, E., Bagheri-Fam, S., Harley, V.R., Schlessinger, D., Bowles, J., Koopman, P., 2011. Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB J* 25, 3561–3569. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184333>
- Kataria, A., Levine, D., Wertenteil, S., Vento, S., Xue, J., Rajendiran, K., Kannan, K., Thurman, J.M., Morrison, D., Brody, R., Urbina, E., Attina, T., Trasande, L., Trachtman, H., 2017. Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr Res* 81, 857–864. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.16>
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., Sasaki, H., 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16, 2272–2280. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm179>
- Kato, Y., Katsuki, T., Kokubo, H., Masuda, A., Saga, Y., 2016. Dazl is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat Commun* 7, 11272. <https://doi.org/10.1038/ncomms11272>
- Kaur, S., Saluja, M., Bansal, M.P., 2018. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia* 50. <https://doi.org/10.1111/and.12834>
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 715–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>
- Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N., 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81876-0)
- Khan, R.A., Khan, M.R., Sahreen, S., 2012. Protective effects of *Sonchus asper* against KBrO₃ induced lipid peroxidation in rats. *Lipids Health Dis* 11, 164. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-164>
- Kharat, S.S., Sharan, S.K., 2020. Exploring role of 5hmC as potential marker of chemoresistance. *Mol Cell Oncol* 7, 1827904. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1827904>

- Kietzmann, T., Petry, A., Shvetsova, A., Gerhold, J.M., Görlach, A., 2017. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 174, 1533–1554. <https://doi.org/10.1111/bph.13792>
- Kim, D.-H., Park, C.G., Kim, S.H., Kim, Y.J., 2019. The Effects of Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) on Human Estrogen Receptor (hER) and Androgen Receptor (hAR) by YES/YAS In Vitro Assay. *Molecules* 24, 1558. <https://doi.org/10.3390/molecules24081558>
- Kim, J.-E., Choi, S., Yoo, J.-A., Chung, M.-H., 2004. 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Lett* 556, 104–110. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01385-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01385-1)
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.-C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2006. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4, e187. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040187>
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., Barnes, D.E., 1999. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13300–13305. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13300>
- Knight, P.G., Glistler, C., 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Kobayashi, A., Chang, H., Chaboissier, M.-C., Schedl, A., Behringer, R.R., 2005. Sox9 in testis determination. *Ann N Y Acad Sci* 1061, 9–17. <https://doi.org/10.1196/annals.1336.003>
- Koizume, S., Inoue, H., Kamiya, H., Ohtsuka, E., 1998. Neighboring base damage induced by permanganate oxidation of 8-oxoguanine in DNA. *Nucleic Acids Res* 26, 3599–3607. <https://doi.org/10.1093/nar/26.15.3599>
- Kojima, Y., Yamashiro, C., Murase, Y., Yabuta, Y., Okamoto, I., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakaya, M., Tsukiyama, T., Nakamura, T., Yamamoto, T., Saitou, M., 2021. GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program. *Life Sci Alliance* 4, e202000974. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000974>
- Kong, Q., Lin, C.-L.G., 2010. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci* 67, 1817–1829. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0277-y>
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., Page, D.C., 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2474–2479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R., 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90515-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90515-r)
- Kubo, N., Toh, H., Shirane, K., Shirakawa, T., Kobayashi, H., Sato, T., Sone, H., Sato, Y., Tomizawa, S., Tsurusaki, Y., Shibata, H., Saito, H., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Suyama, M., Kono, T., Ohbo, K., Sasaki, H., 2015. DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis. *BMC Genomics* 16, 624. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1833-5>
- Kudjawu, Y., Uhry, Z., Danzon, A., Bloch, J., 2012. Évolution nationale et variations régionales du taux de patients opérés pour cancer du testicule en France, 1998–2008 (Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'institut de veille sanitaire).
- Kumar, S., Chatzi, C., Brade, T., Cunningham, T.J., Zhao, X., Duester, G., 2011. Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat Commun* 2, 151. <https://doi.org/10.1038/ncomms1136>
- Kumar, S., Saxena, J., Srivastava, V.K., Kaushik, S., Singh, H., Abo-El-Sooud, K., Abdel-Daim, M.M., Jyoti, A., Saluja, R., 2022. The Interplay of Oxidative Stress and ROS Scavenging: Antioxidants as a Therapeutic Potential in Sepsis. *Vaccines (Basel)* 10, 1575. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101575>

- Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P., Champagne, F.A., 2013. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9956–9961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214056110>
- Kunisada, M., Sakumi, K., Tominaga, Y., Budiyo, A., Ueda, M., Ichihashi, M., Nakabeppu, Y., Nishigori, C., 2005. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65, 6006–6010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0724>
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., Totoki, Y., Shibata, T., Kimura, T., Nakatsuji, N., Noce, T., Sasaki, H., Nakano, T., 2010. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 24, 887–892. <https://doi.org/10.1101/gad.1902110>
- Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., Kokubo, T., Odashima, S., 1983. Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 71, 965–972.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., Hayashi, Y., 1990. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate—a new renal carcinogen. *Environ Health Perspect* 87, 309–335. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087309>
- Lacroix, M.Z., Puel, S., Collet, S.H., Corbel, T., Picard-Hagen, N., Toutain, P.L., Vigié, C., Gayraud, V., 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85, 2053–2059. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.040>
- Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Trznadel, M., Trunkfield, L.A., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Paull, G.C., Wilson, R.J., Mill, J., Santos, E.M., 2016. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics* 11, 526–538. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1182272>
- Laird, D.J., Altshuler-Keylin, S., Kissner, M.D., Zhou, X., Anderson, K.V., 2011. Ror2 enhances polarity and directional migration of primordial germ cells. *PLoS Genet* 7, e1002428. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002428>
- Laqqan, M., Tierling, S., Alkhaled, Y., Porto, C.L., Solomayer, E.F., Hammadeh, M.E., 2017. Aberrant DNA methylation patterns of human spermatozoa in current smoker males. *Reprod Toxicol* 71, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.05.010>
- Law, N.C., Oatley, M.J., Oatley, J.M., 2019. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage. *Nat Commun* 10, 2787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10596-0>
- Lawson, C., Gieske, M., Murdoch, B., Ye, P., Li, Y., Hassold, T., Hunt, P.A., 2011. Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. *Biol Reprod* 84, 79–86. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084814>
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., Hogan, B.L., 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424–436. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>
- Lawson, K.A., Hage, W.J., 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 68–84; discussion 84–91. <https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch5>
- Le Page, F., Klungland, A., Barnes, D.E., Sarasin, A., Boiteux, S., 2000a. Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8397–8402. <https://doi.org/10.1073/pnas.140137297>
- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J., Sarasin, A., 2000b. BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60, 5548–5552.

- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 55, 548–573. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>
- Lee, T.-H., Kang, T.-H., 2019. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int J Mol Sci* 20, 6092. <https://doi.org/10.3390/ijms20236092>
- Legoff, L., Dali, O., D’Cruz, S.C., Suglia, A., Gely-Pernot, A., Hémery, C., Kernanec, P.-Y., Demmouche, A., Kervarrec, C., Tevosian, S., Multigner, L., Smagulova, F., 2019. Ovarian dysfunction following prenatal exposure to an insecticide, chlordecone, associates with altered epigenetic features. *Epigenetics Chromatin* 12, 29. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0276-7>
- Lei, L., Spradling, A.C., 2016. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells. *Science* 352, 95–99. <https://doi.org/10.1126/science.aad2156>
- Li, L., Dong, J., Yan, L., Yong, J., Liu, X., Hu, Y., Fan, X., Wu, X., Guo, H., Wang, X., Zhu, X., Li, R., Yan, J., Wei, Y., Zhao, Y., Wang, W., Ren, Y., Yuan, P., Yan, Z., Hu, B., Guo, F., Wen, L., Tang, F., Qiao, J., 2017. Single-Cell RNA-Seq Analysis Maps Development of Human Germline Cells and Gonadal Niche Interactions. *Cell Stem Cell* 20, 858-873.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.03.007>
- Li, Y., Duan, F., Zhou, X., Pan, H., Li, R., 2018. Differential responses of GC-1 spermatogonia cells to high and low doses of bisphenol A. *Mol Med Rep* 18, 3034–3040. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9256>
- Li, Y., Liu, S., Gao, F., Peng, Z., Zhang, J., Li, S., Lu, D., Pan, X., 2023. BPA interferes with granulosa cell development and oocyte meiosis in mouse preantral follicles. *Exp Biol Med (Maywood)* 248, 1145–1158. <https://doi.org/10.1177/15353702231179940>
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd, M.A., Moon, H.-B., Nakata, H., Kannan, K., 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol* 46, 6860–6866. <https://doi.org/10.1021/es301334j>
- Liao, J., Ng, S.H., Luk, A.C., Suen, H.C., Qian, Y., Lee, A.W.T., Tu, J., Fung, J.C.L., Tang, N.L.S., Feng, B., Chan, W.Y., Fouchet, P., Hobbs, R.M., Lee, T.L., 2019. Revealing cellular and molecular transitions in neonatal germ cell differentiation using single cell RNA sequencing. *Development* 146, dev174953. <https://doi.org/10.1242/dev.174953>
- Lindahl, T., Barnes, D.E., 2000. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 127–133. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis* 4, e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>
- Liu, J.-C., Lai, F.-N., Li, Ling, Sun, X.-F., Cheng, S.-F., Ge, W., Wang, Y.-F., Li, Lan, Zhang, X.-F., De Felici, M., Dyce, P.W., Shen, W., 2017. Di (2-ethylhexyl) phthalate exposure impairs meiotic progression and DNA damage repair in fetal mouse oocytes in vitro. *Cell Death Dis* 8, e2966. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.350>
- Liu, X., Wang, Z., Liu, F., 2021. Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice. *Chemosphere* 262, 127880. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127880>
- Liu, Y., Zhang, Yanping, Yin, J., Gao, Y., Li, Y., Bai, D., He, W., Li, X., Zhang, P., Li, R., Zhang, L., Jia, Y., Zhang, Yalin, Lin, J., Zheng, Y., Wang, H., Gao, S., Zeng, W., Liu, W., 2019. Distinct H3K9me3 and DNA methylation modifications during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 294, 18714–18725. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010496>
- Logan, K., Zhang, J., Davis, E.A., Ackerman, S., 1989. Drug inhibitors of RNA polymerase II transcription. *DNA* 8, 595–604. <https://doi.org/10.1089/dna.1989.8.595>
- Loup, B., Poumerol, E., Jouneau, L., Fowler, P.A., Cotinot, C., Mandon-Pépin, B., 2022. BPA disrupts meiosis I in oogonia by acting on pathways including cell cycle regulation, meiosis initiation

- and spindle assembly. *Reprod Toxicol* 111, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.001>
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., Yankner, B.A., 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883–891. <https://doi.org/10.1038/nature02661>
- Lucifero, D., Mann, M.R.W., Bartolomei, M.S., Trasler, J.M., 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13, 839–849. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh104>
- Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9)
- Maatouk, D.M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K.L., Taketo, M.M., Capel, B., 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 17, 2949–2955. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn193>
- Maatouk, D.M., Kellam, L.D., Mann, M.R.W., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M.S., Resnick, J.L., 2006. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development* 133, 3411–3418. <https://doi.org/10.1242/dev.02500>
- MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., Petkovich, M., 2007. Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 148, 4560–4567. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0492>
- MacLennan, M., Crichton, J.H., Playfoot, C.J., Adams, I.R., 2015. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol* 45, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.005>
- Madison, R.W., Hu, X., Ramanan, V., Xu, Z., Huang, R.S.P., Sokol, E.S., Frampton, G.M., Schrock, A.B., Ali, S.M., Ganesan, S., De, S., 2022. Clustered 8-Oxo-Guanine Mutations and Oncogenic Gene Fusions in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *JCO Precis Oncol* 6, e2100477. <https://doi.org/10.1200/PO.21.00477>
- Mäkelä, J.-A., Cisneros-Montalvo, S., Lehtiniemi, T., Olotu, O., La, H.M., Toppari, J., Hobbs, R.M., Parvinen, M., Kotaja, N., 2020. Transillumination-Assisted Dissection of Specific Stages of the Mouse Seminiferous Epithelial Cycle for Downstream Immunostaining Analyses. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/61800>
- Mäkelä, J.-A., Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2019. Testis Development. *Endocr Rev* 40, 857–905. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00140>
- Maltseva, D.V., Baykov, A.A., Jeltsch, A., Gromova, E.S., 2009. Impact of 7,8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by Dnmt3a. *Biochemistry* 48, 1361–1368. <https://doi.org/10.1021/bi801947f>
- Mamsen, L.S., Brøchner, C.B., Byskov, A.G., Møllgard, K., 2012. The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol* 56, 771–778. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120202lm>
- Mangerich, A., Knutson, C.G., Parry, N.M., Muthupalani, S., Ye, W., Prestwich, E., Cui, L., McFaline, J.L., Mobley, M., Ge, Z., Taghizadeh, K., Wishnok, J.S., Wogan, G.N., Fox, J.G., Tannenbaum, S.R., Dedon, P.C., 2012. Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1820–E1829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207829109>
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K., 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One* 8, e55387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>
- Mao, S.-Q., Ghanbarian, A.T., Spiegel, J., Martínez Cuesta, S., Beraldi, D., Di Antonio, M., Marsico, G., Hänsel-Hertsch, R., Tannahill, D., Balasubramanian, S., 2018. DNA G-quadruplex structures

- mold the DNA methylome. *Nat Struct Mol Biol* 25, 951–957. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0131-8>
- Marietta, C., Brooks, P.J., 2007. Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO Rep* 8, 388–393. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400932>
- Matsui, Y., Okamura, D., 2005. Mechanisms of germ-cell specification in mouse embryos. *Bioessays* 27, 136–143. <https://doi.org/10.1002/bies.20178>
- Matuszczak, E., Komarowska, M.D., Debek, W., Hermanowicz, A., 2019. The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. *Int J Endocrinol* 2019, 4068717. <https://doi.org/10.1155/2019/4068717>
- Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296, 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>
- McCarrey, J.R., 2013. Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents. *Biol Reprod* 89, 47. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110502>
- McGee, E.A., Hsueh, A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- McLaren, A., 2000. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 163, 3–9. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00234-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00234-8)
- Membrino, A., Cogoi, S., Pedersen, E., Xodo, X., 2011. G4-DNA formation in the HRAS promoter and rational design of decoy oligonucleotides for cancer therapy. *PloS one* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024421>
- Menezes, Y.J.R., Silvestris, E., Dale, B., Elder, K., 2016. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online* 33, 668–683. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.006>
- Menke, D.B., Koubova, J., Page, D.C., 2003. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 262, 303–312. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00391-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00391-9)
- Mescher, A., 2010. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas (12th ed.)*, by Anthony L. Mescher.
- Miao, M., Zhou, X., Li, Y., Zhang, O., Zhou, Z., Li, T., Yuan, W., Li, R., Li, D.-K., 2014. LINE-1 hypomethylation in spermatozoa is associated with Bisphenol A exposure. *Andrology* 2, 138–144. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00166.x>
- Migdal, C., Serres, M., 2011. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris)* 27, 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Mínguez-Alarcón, L., Hauser, R., Gaskins, A.J., 2016. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertil Steril* 106, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1118>
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S., Noda, T., 2000. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4156–4161. <https://doi.org/10.1073/pnas.050404497>
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., Aizawa, S., 1997. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124, 1653–1664. <https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1653>
- Mk, H.-M., Jm, K., Bd, M., Kd, S., 2003. Oxidized guanine lesions as modulators of gene transcription. Altered p50 binding affinity and repair shielding by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine lesions in the NF-kappaB promoter element. *Biochemistry* 42. <https://doi.org/10.1021/bi034546k>
- Møller, H., Skakkebaek, N.E., 1999. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ* 318, 559–562. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7183.559>

- Molyneaux, K.A., Stallock, J., Schaible, K., Wylie, C., 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 240, 488–498. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0436>
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., Lehmann, R., 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130, 4279–4286. <https://doi.org/10.1242/dev.00640>
- Mondal, S., Ghosh, S., Bhattacharya, S., Mukherjee, S., 2019. Chronic dietary administration of lower levels of diethyl phthalate induces murine testicular germ cell inflammation and sperm pathologies: Involvement of oxidative stress. *Chemosphere* 229, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.017>
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., Englert, C., Kim, Y., Capel, B., Eguchi, N., Urade, Y., Boizet-Bonhoure, B., Poulat, F., 2009. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* 136, 1813–1821. <https://doi.org/10.1242/dev.032631>
- Monks, T.J., Xie, R., Tikoo, K., Lau, S.S., 2006. Ros-induced histone modifications and their role in cell survival and cell death. *Drug Metab Rev* 38, 755–767. <https://doi.org/10.1080/03602530600959649>
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Moore, S.P.G., Toomire, K.J., Strauss, P.R., 2013. DNA modifications repaired by base excision repair are epigenetic. *DNA Repair (Amst)* 12, 1152–1158. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.002>
- Motta, P.M., Makabe, S., Nottola, S.A., 1997. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update* 3, 281–295. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.3.281>
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* 258, 210–220. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000201\)258:2<210::AID-AR10>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<210::AID-AR10>3.0.CO;2-X)
- Nagaoka, S.I., Hassold, T.J., Hunt, P.A., 2012. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 13, 493–504. <https://doi.org/10.1038/nrg3245>
- Nakabeppu, Y., 2014. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci* 15, 12543–12557. <https://doi.org/10.3390/ijms150712543>
- Nakabeppu, Y., 2001. Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1. *Mutat Res* 477, 59–70. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00096-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00096-3)
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., Nakatsu, Y., 2006. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387, 373–379. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.050>
- Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A., Milbrandt, J., 2006. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* 74, 314–321. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047365>
- Nelson, P.T., Keller, J.N., 2007. RNA in brain disease: no longer just “the messenger in the middle.” *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 461–468. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240474.27791.f3>
- Nicholls, P.K., Schorle, H., Naqvi, S., Hu, Y.-C., Fan, Y., Carmell, M.A., Dobrinski, I., Watson, A.L., Carlson, D.F., Fahrenkrug, S.C., Page, D.C., 2019. Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 25677–25687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910733116>

- Nowsheen, S., Yang, E.S., 2012. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol* 34, 243–254.
- Nugud, A., Sandeep, D., El-Serafi, A.T., 2018. Two faces of the coin: Minireview for dissecting the role of reactive oxygen species in stem cell potency and lineage commitment. *J Adv Res* 14, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.012>
- Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B., Trasler, J.M., 2007. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 307, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.002>
- Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., Oatley, J.M., 2011. Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol Reprod* 85, 347–356. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091330>
- O'Donnell, L., 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* 4, e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>
- Odronec, A., Olszewska, M., Kurpisz, M., 2023. Epigenetic markers in the embryonal germ cell development and spermatogenesis. *Basic Clin Androl* 33, 6. <https://doi.org/10.1186/s12610-022-00179-3>
- O'Hagan, H.M., Wang, W., Sen, S., Destefano Shields, C., Lee, S.S., Zhang, Y.W., Clements, E.G., Cai, Y., Van Neste, L., Easwaran, H., Casero, R.A., Sears, C.L., Baylin, S.B., 2011. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 20, 606–619. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.012>
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., Surani, M.A., 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 207–213. <https://doi.org/10.1038/nature03813>
- Ohkura, H., 2015. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a015859. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015859>
- Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y., Nakabeppu, Y., 2014. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep* 4, 4689. <https://doi.org/10.1038/srep04689>
- Oka, S., Ohno, M., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., 2008. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27, 421–432. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601975>
- Okutman, O., Muller, J., Baert, Y., Serdarogullari, M., Gultomruk, M., Piton, A., Rombaut, C., Benkhalifa, M., Teletin, M., Skory, V., Bakircioglu, E., Goossens, E., Bahceci, M., Viville, S., 2015. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet* 24, 5581–5588. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv290>
- Oliveira, C.P.A. de, Carneiro, A.A., Ervilha, L.O.G., Machado-Neves, M., Souza, A.C.F., Carvalho, R.P.R., 2023. Does environmental pollution affect male reproductive system in naturally exposed vertebrates? A systematic review. *Theriogenology* 198, 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.004>
- Omega, C.A., Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2018. The Fifth Domain in the G-Quadruplex-Forming Sequence of the Human NEIL3 Promoter Locks DNA Folding in Response to Oxidative Damage. *Biochemistry* 57, 2958–2970. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00226>
- Oosterhuis, J.W., Looijenga, L.H.J., 2019. Human germ cell tumours from a developmental perspective. *Nat Rev Cancer* 19, 522–537. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0178-9>
- Orth, J.M., Qiu, J., Jester, W.F., Pilder, S., 1997. Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biol Reprod* 57, 676–683. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.3.676>

- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T., Epe, B., 2001. Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22, 1459–1463. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.9.1459>
- Pagotto, R., Santamaría, C.G., Harreguy, M.B., Abud, J., Zenclussen, M.L., Kass, L., Crispo, M., Muñoz-de-Toro, M.M., Rodríguez, H.A., Bollati-Fogolín, M., 2020. Perinatal exposure to Bisphenol A disturbs the early differentiation of male germ cells. *Reprod Toxicol* 98, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.004>
- Paigen, K., Petkov, P., 2010. Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet* 11, 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrg2712>
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Servel, N., Taourit, S., Furet, J.P., Fellous, M., Grosclaude, F., Crihiu, E.P., Cotinot, C., Vaiman, D., 2001. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* 29, 453–458. <https://doi.org/10.1038/ng769>
- Palumbo, S.L., Memmott, R.M., Uribe, D.J., Krotova-Khan, Y., Hurley, L.H., Ebbinghaus, S.W., 2008. A novel G-quadruplex-forming GGA repeat region in the c-myc promoter is a critical regulator of promoter activity. *Nucleic Acids Res* 36, 1755–1769. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1069>
- Pan, H., Jiang, N., Sun, S., Jiang, H., Xu, J., Jiang, X., Gao, Q., Li, L., Wu, H., Zheng, H., Qi, Q., Li, T., Zhang, M., Zhang, L., Wan, X., Lin, X., Wong, J., Shi, Q., Li, R., 2020. UHRF1-repressed 5'-hydroxymethylcytosine is essential for the male meiotic prophase I. *Cell Death Dis* 11, 142. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2333-3>
- Pan, L., Zhu, B., Hao, W., Zeng, X., Vlahopoulos, S.A., Hazra, T.K., Hegde, M.L., Radak, Z., Bacsi, A., Brasier, A.R., Ba, X., Boldogh, I., 2016. Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor κ B-driven Gene Expression. *J Biol Chem* 291, 25553–25566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751453>
- Paredes, J.A., Ezerskyte, M., Bottai, M., Dreij, K., 2017. Transcriptional mutagenesis reduces splicing fidelity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 45, 6520–6529. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx339>
- Park, J.-Y., Su, Y.-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.-L.C., Conti, M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682–684. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>
- Parsons, J.L., Zharkov, D.O., Dianov, G.L., 2005. NEIL1 excises 3' end proximal oxidative DNA lesions resistant to cleavage by NTH1 and OGG1. *Nucleic Acids Res* 33, 4849–4856. <https://doi.org/10.1093/nar/gki816>
- Pastukh, V., Roberts, J.T., Clark, D.W., Bardwell, G.C., Patel, M., Al-Mehdi, A.-B., Borchert, G.M., Gillespie, M.N., 2015. An oxidative DNA “damage” and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309, L1367–1375. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00236.2015>
- Paz-Elizur, T., Krupsky, M., Blumenstein, S., Elinger, D., Schechtman, E., Livneh, Z., 2003. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 1312–1319. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg033>
- Paz-Elizur, T., Sevilya, Z., Leitner-Dagan, Y., Elinger, D., Roisman, L.C., Livneh, Z., 2008. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett* 266, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.032>
- Pelch, K.E., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.-H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S.A., Thayer, K.A., 2017. NTP Research Report on Biological Activity of Bisphenol A (BPA) Structural Analogues and Functional Alternatives: Research Report 4, NTP Research Reports. National Toxicology Program, Research Triangle Park (NC).

- Pepling, M.E., Spradling, A.C., 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 234, 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W.A., Hunt, P.A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H.S., Swan, S.H., VandeVoort, C.A., Flaws, J.A., 2014. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ Health Perspect* 122, 775–786. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307728>
- Perillo, B., Ombra, M.N., Bertoni, A., Cuozzo, C., Sacchetti, S., Sasso, A., Chiariotti, L., Malorni, A., Abbondanza, C., Avvedimento, E.V., 2008. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science* 319, 202–206. <https://doi.org/10.1126/science.1147674>
- Peters, A., Nawrot, T.S., Baccarelli, A.A., 2021. Hallmarks of environmental insults. *Cell* 184, 1455–1468. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.043>
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4, 89–96.
- Piprek, R.P., Kloc, M., Kubiak, J.Z., 2016. Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. *Results Probl Cell Differ* 58, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_1
- Pizzorno, J., 2018. Environmental Toxins and Infertility. *Integr Med (Encinitas)* 17, 8–11.
- Poetsch, A.R., Boulton, S.J., Luscombe, N.M., 2018. Genomic landscape of oxidative DNA damage and repair reveals regioselective protection from mutagenesis. *Genome Biol* 19, 215. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1582-2>
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Reik, W., 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105. <https://doi.org/10.1038/nature08829>
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Fertala, J., Wang, D., Park, H.J., Essigmann, J.M., Bjornsti, M.A., Pommier, Y., 1999. Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem* 274, 8516–8523. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8516>
- Pratviel, G., Meunier, B., 2006. Guanine oxidation: one- and two-electron reactions. *Chemistry* 12, 6018–6030. <https://doi.org/10.1002/chem.200600539>
- Puebla-Osorio, N., Lacey, D.B., Alt, F.W., Zhu, C., 2006. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Mol Cell Biol* 26, 3935–3941. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3935-3941.2006>
- Pui, H.P., Saga, Y., 2018. NANOS2 acts as an intrinsic regulator of gonocytes-to-spermatogonia transition in the murine testes. *Mech Dev* 149, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.01.001>
- Pui, H.P., Saga, Y., 2017. Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mech Dev* 144, 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.03.002>
- Qu, W., Liu, C., Xu, Y.-T., Xu, Y.-M., Luo, M.-C., 2021. The formation and repair of DNA double-strand breaks in mammalian meiosis. *Asian J Androl* 23, 572–579. <https://doi.org/10.4103/aja202191>
- Radak, Z., Boldogh, I., 2010. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 49, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.008>
- Rahman, M.S., Kang, K.-H., Arifuzzaman, S., Pang, W.-K., Ryu, D.-Y., Song, W.-H., Park, Y.-J., Pang, M.-G., 2019. Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model. *Sci Rep* 9, 10584. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47158-9>
- Rajpert-De Meyts, E., 2006. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 12, 303–323. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk006>

- Ramon, O., Sauvaigo, S., Gasparutto, D., Faure, P., Favier, A., Cadet, J., 1999. Effects of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine on the binding of the transcription factor Sp1 to its cognate target DNA sequence (GC box). *Free Radic Res* 31, 217–229. <https://doi.org/10.1080/10715769900300781>
- Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., Flaws, J.A., 2017. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol* 233, R109–R129. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0023>
- Ravanat, J.-L., Cadet, J., Douki, T., 2012. Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr Mol Med* 12, 655–671. <https://doi.org/10.2174/156652412800792651>
- Raverdeau, M., Gely-Pernot, A., Féret, B., Dennefeld, C., Benoit, G., Davidson, I., Chambon, P., Mark, M., Ghyselinck, N.B., 2012. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16582–16587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214936109>
- Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H., Sancar, A., 1997. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9463–9468. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9463>
- Ribeiro, J., Abby, E., Livera, G., Martini, E., 2016. RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* 125, 265–276. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0552-7>
- Ribeiro, J., Dupaigne, P., Petrillo, C., Ducrot, C., Duquenne, C., Veaute, X., Saintomé, C., Busso, D., Guerois, R., Martini, E., Livera, G., 2021. The meiosis-specific MEIOB-SPATA22 complex cooperates with RPA to form a compacted mixed MEIOB/SPATA22/RPA/ssDNA complex. *DNA Repair (Amst)* 102, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103097>
- Richardson, B.E., Lehmann, R., 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 37–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24, 199–224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>
- Rosario, R., Smith, R.W.P., Adams, I.R., Anderson, R.A., 2017. RNA immunoprecipitation identifies novel targets of DAZL in human foetal ovary. *Mol Hum Reprod* 23, 177–186. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax004>
- Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Muczynski, V., Moison, D., Tourpin, S., Messiaen, S., Habert, R., Livera, G., 2015. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 58. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00058>
- Rowdhwal, S.S.S., Chen, J., 2018. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *Biomed Res Int* 2018, 1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>
- Roy, D., Cai, Q., Felty, Q., Narayan, S., 2007. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10, 235–257. <https://doi.org/10.1080/15287390600974924>
- Roychoudhury, S., Pramanik, S., Harris, H.L., Tarpley, M., Sarkar, A., Spagnol, G., Sorgen, P.L., Chowdhury, D., Band, V., Klinkebiel, D., Bhakat, K.K., 2020. Endogenous oxidized DNA bases and APE1 regulate the formation of G-quadruplex structures in the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 11409–11420. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912355117>
- Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., Wylie, C., 2006. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133, 4861–4869. <https://doi.org/10.1242/dev.02688>
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D.E., Lindahl, T., Yang, H., Miller, J.H., Bignami, M., 2004. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA

- of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* 64, 4411–4414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0355>
- Saba, R., Kato, Y., Saga, Y., 2014. NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Dev Biol* 385, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.018>
- Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., Saga, Y., 2009. The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* 325, 1394–1398. <https://doi.org/10.1126/science.1172645>
- Sai, K., Umemura, T., Takagi, A., Hasegawa, R., Kurokawa, Y., 1992. The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Jpn J Cancer Res* 83, 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1992.tb02350.x>
- Sainz de la Maza, D., Moratilla, A., Aparicio, V., Lorca, C., Alcaina, Y., Martín, D., De Miguel, M.P., 2017. Metabolic Reprogramming, Autophagy, and Reactive Oxygen Species Are Necessary for Primordial Germ Cell Reprogramming into Pluripotency. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 4745252. <https://doi.org/10.1155/2017/4745252>
- Saitou, M., Barton, S.C., Surani, M.A., 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293–300. <https://doi.org/10.1038/nature00927>
- Saitou, M., Kagiwada, S., Kurimoto, K., 2012. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139, 15–31. <https://doi.org/10.1242/dev.050849>
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci* 85, 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.004>
- Sampath, H., Vartanian, V., Rollins, M.R., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Lloyd, R.S., 2012. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One* 7, e51697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051697>
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77, 229–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- Sasaki, K., Sangrithi, M., 2023. Developmental origins of mammalian spermatogonial stem cells: New perspectives on epigenetic regulation and sex chromosome function. *Mol Cell Endocrinol* 573, 111949. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111949>
- Saxowsky, T.T., Meadows, K.L., Klungland, A., Doetsch, P.W., 2008. 8-Oxoguanine-mediated transcriptional mutagenesis causes Ras activation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18877–18882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806464105>
- Schemmer, J., Araúzo-Bravo, M.J., Haas, N., Schäfer, S., Weber, S.N., Becker, A., Eckert, D., Zimmer, A., Nettersheim, D., Schorle, H., 2013. Transcription factor TFAP2C regulates major programs required for murine fetal germ cell maintenance and haploinsufficiency predisposes to teratomas in male mice. *PLoS One* 8, e71113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071113>
- Schulz, W.A., Steinhoff, C., Florl, A.R., 2006. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310, 211–250. https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_11
- Scj, R., Am, F., Cj, B., 2019. Oxidative Modification of the Potential G-Quadruplex Sequence in the PCNA Gene Promoter Can Turn on Transcription. *Chemical research in toxicology* 32. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00332>
- Sedletska, Y., Radicella, J.P., Sage, E., 2013. Replication fork collapse is a major cause of the high mutation frequency at three-base lesion clusters. *Nucleic Acids Res* 41, 9339–9348. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt731>
- Seifermann, M., Epe, B., 2017. Oxidatively generated base modifications in DNA: Not only carcinogenic risk factor but also regulatory mark? *Free Radical Biology and Medicine, Oxidative DNA Damage & Repair* 107, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.018>
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., Reik, W., 2012. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming

- in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 48, 849–862. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.001>
- Seki, Y., 2018. PRDM14 Is a Unique Epigenetic Regulator Stabilizing Transcriptional Networks for Pluripotency. *Front Cell Dev Biol* 6, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00012>
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y., 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 278, 440–458. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.025>
- Seligman, J., Page, D.C., 1998. The Dazl gene is expressed in male and female embryonic gonads before germ cell sex differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 878–882. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8530>
- Sengupta, S., Wang, H., Yang, C., Szczesny, B., Hegde, M.L., Mitra, S., 2020. Ligand-induced gene activation is associated with oxidative genome damage whose repair is required for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 22183–22192. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919445117>
- Sha, Y.-W., Wang, X., Su, Z.-Y., Wang, C., Ji, Z.-Y., Mei, L.-B., Zhang, L., Deng, B.-B., Huang, X.-J., Yan, W., Chen, J., Li, P., Cui, Y.-Q., Qu, Q.-L., Yin, C., He, X.-M., 2018. TDRD6 is associated with oligoasthenoteratozoospermia by sequencing the patient from a consanguineous family. *Gene* 659, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.040>
- Shan, X., Chang, Y., Lin, C.G., 2007. Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *FASEB J* 21, 2753–2764. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8200com>
- Shan, X., Tashiro, H., Lin, C.G., 2003. The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23, 4913–4921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-04913.2003>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Zucca, P., Varoni, E.M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P.V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M.E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A.O., Setzer, W.N., Calina, D., Cho, W.C., Sharifi-Rad, J., 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol* 11, 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A.P., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431–434. <https://doi.org/10.1038/349431a0>
- Shimada, R., Koike, H., Hirano, T., Kato, Y., Saga, Y., 2021. NANOS2 suppresses the cell cycle by repressing mTORC1 activators in embryonic male germ cells. *iScience* 24, 102890. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102890>
- Shin, N., Cuenca, L., Karthikraj, R., Kannan, K., Colaiácovo, M.P., 2019. Assessing effects of germline exposure to environmental toxicants by high-throughput screening in *C. elegans*. *PLoS Genet* 15, e1007975. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007975>
- Shirakawa, T., Yaman-Deveci, R., Tomizawa, S.-I., Kamizato, Y., Nakajima, K., Sone, H., Sato, Y., Sharif, J., Yamashita, A., Takada-Horisawa, Y., Yoshida, S., Ura, K., Muto, M., Koseki, H., Suda, T., Ohbo, K., 2013. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. *Development* 140, 3565–3576. <https://doi.org/10.1242/dev.094045>
- Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., Kono, T., Sasaki, H., 2013. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet* 9, e1003439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003439>
- Sidorkiewicz, I., Czerniecki, J., Jarzabek, K., Zbucka-Krętowska, M., Wołczyński, S., 2018. Cellular, transcriptomic and methylome effects of individual and combined exposure to BPA, BPF, BPS

- on mouse spermatocyte GC-2 cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 359, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.006>
- Silber, S.J., 1984. *Reproductive infertility microsurgery in the male and female*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. ed.
- Sinenko, S.A., Starkova, T.Y., Kuzmin, A.A., Tomilin, A.N., 2021. Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man. *Front Cell Dev Biol* 9, 714370. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.714370>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev* 96, 55–97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>
- Skinner, M.K., 2014. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol* 398, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.019>
- Snezhkina, A.V., Kudryavtseva, A.V., Kardymon, O.L., Savvateeva, M.V., Melnikova, N.V., Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A., 2019. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., Pardalidis, N., 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.004>
- Song, H.-W., Wilkinson, M.F., 2014. Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 30, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.005>
- Sonne, S.B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A.S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N.J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P.E., Brunak, S., Gjerdrum, L.M., Moore, H.D., Andrews, P.W., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., 2009. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 69, 5241–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4554>
- Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., Duquenne, C., Messiaen, S., Martini, E., Bernardino-Sgherri, J., Toth, A., Habert, R., Livera, G., 2013. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 9, e1003784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>
- Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., Livera, G., 2012. Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology* 153, 2466–2473. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2056>
- Speed, R.M., 1982. Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* 85, 427–437. <https://doi.org/10.1007/BF00330366>
- Speit, G., Haupter, S., Schütz, P., Kreis, P., 1999. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res* 439, 213–221. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(98\)00200-9](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(98)00200-9)
- Spiegel, J., Cuesta, S.M., Adhikari, S., Hänsel-Hertsch, R., Tannahill, D., Balasubramanian, S., 2021. G-quadruplexes are transcription factor binding hubs in human chromatin. *Genome Biol* 22, 117. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02324-z>
- Spiller, C., Koopman, P., Bowles, J., 2017. Sex Determination in the Mammalian Germline. *Annu Rev Genet* 51, 265–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035449>
- Spiller, C.M., Wilhelm, D., Koopman, P., 2010. Retinoblastoma 1 protein modulates XY germ cell entry into G1/G0 arrest during fetal development in mice. *Biol Reprod* 82, 433–443. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078691>
- Stasia, M.-J., 2007. [The X+ chronic granulomatous disease as a fabulous model to study the NADPH oxidase complex activation]. *Med Sci (Paris)* 23, 526–532. <https://doi.org/10.1051/medsci/2007235526>

- Stewart, K.R., Veselovska, L., Kelsey, G., 2016. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics* 8, 1399–1413. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0056>
- Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B.J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J.K., Martinson, J.J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K., Yokota, J., 1999. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 669–674.
- Sugiyama, K.-I., Kinoshita, M., Grúz, P., Kasamatsu, T., Honma, M., 2022. Bisphenol-A reduces DNA methylation after metabolic activation. *Genes Environ* 44, 20. <https://doi.org/10.1186/s41021-022-00249-y>
- Sun, W., Zang, L., Shu, Q., Li, X., 2014. From development to diseases: the role of 5hmC in brain. *Genomics* 104, 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.021>
- Sun, Y.-C., Sun, X.-F., Dyce, P.W., Shen, W., Chen, H., 2017. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci* 13, 449–457. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18836>
- Susiarjo, M., Hassold, T.J., Freeman, E., Hunt, P.A., 2007. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet* 3, e5. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030005>
- Suzuki, A., Saga, Y., 2008. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 22, 430–435. <https://doi.org/10.1101/gad.1612708>
- Syal, S., Ng, C., Kim, Y., Janbieh, J., Govind, S., Deshpande, G., 2020. Reactive oxygen species signaling in primordial germ cell development in *Drosophila* embryos. *Genesis* 58, e23362. <https://doi.org/10.1002/dvg.23362>
- Takada, Y., Yaman-Deveci, R., Shirakawa, T., Sharif, J., Tomizawa, S.-I., Miura, F., Ito, T., Ono, M., Nakajima, K., Koseki, Y., Shiotani, F., Ishiguro, K.-I., Ohbo, K., Koseki, H., 2021. Maintenance DNA methylation in pre-meiotic germ cells regulates meiotic prophase by facilitating homologous chromosome pairing. *Development* 148, dev194605. <https://doi.org/10.1242/dev.194605>
- Takase, H.M., Nusse, R., 2016. Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E1489–1497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601461113>
- Takeshima, T., Usui, K., Mori, K., Asai, T., Yasuda, K., Kuroda, S., Yumura, Y., 2021. Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol* 20, 41–52. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12353>
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezaki, Y., Takai, Y., Taketani, Y., 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 51, 165–169. <https://doi.org/10.1507/endocrj.51.165>
- Tam, P.P., Snow, M.H., 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 64, 133–147.
- Tan, K., Song, H.-W., Wilkinson, M.F., 2020. Single-cell RNAseq analysis of testicular germ and somatic cell development during the perinatal period. *Development* 147, dev183251. <https://doi.org/10.1242/dev.183251>
- Tan, S.W.S., Lee, Q.Y., Wong, B.S.E., Cai, Y., Baeg, G.H., 2017. Redox Homeostasis Plays Important Roles in the Maintenance of the *Drosophila* Testis Germline Stem Cells. *Stem Cell Reports* 9, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.034>
- Tan, X., Grollman, A.P., Shibutani, S., 1999. Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. *Carcinogenesis* 20, 2287–2292. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.12.2287>
- Tanaka, M., Chock, P.B., 2021. Oxidative Modifications of RNA and Its Potential Roles in Biosystem. *Front Mol Biosci* 8, 685331. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685331>
- Tanaka, M., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 2007. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 66–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609737104>

- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Noce, T., 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14, 841–853.
- Tasaki, E., Mitaka, Y., Nozaki, T., Kobayashi, K., Matsuura, K., Iuchi, Y., 2018. High expression of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 in long-lived termite kings. *Aging (Albany NY)* 10, 2668–2683. <https://doi.org/10.18632/aging.101578>
- Tata, N.H., Kshirsagar, A., Nangare, N., 2022. Characterization of genetic polymorphisms in oral cancer-related genes pertaining to oxidative stress, carcinogen detoxifying, and DNA repair: A case-control study. *J Cancer Res Ther* 18, 1023–1029. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1057_20
- Tegelenbosch, R.A., de Rooij, D.G., 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 290, 193–200. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90159-d](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90159-d)
- Toshimori, K., 2003. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech* 61, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jemt.10311>
- Tostivint, V., Roumiguié, M., Cormier, L., Valeri, A., 2021. *Embryologie de l'appareil uro-génital*, Elsevier Masson.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T., 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* 93, 139–149. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(00\)00283-5](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00283-5)
- Trabert, B., Chen, J., Devesa, S.S., Bray, F., McGlynn, K.A., 2015. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973–2007. *Andrology* 3, 4–12. <https://doi.org/10.1111/andr.293>
- Turk, P.W., Laayoun, A., Smith, S.S., Weitzman, S.A., 1995. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 16, 1253–1255. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.5.1253>
- Umemura, T., Kanki, K., Kuroiwa, Y., Ishii, Y., Okano, K., Nohmi, T., Nishikawa, A., Hirose, M., 2006. In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci* 97, 829–835. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00248.x>
- Uysal, F., Akkoyunlu, G., Ozturk, S., 2016. DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 33, 690–702. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.08.022>
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A.P., 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405–409. <https://doi.org/10.1038/17068>
- Valinluck, V., Tsai, H.-H., Rogstad, D.K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L.C., 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32, 4100–4108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh739>
- van den Boogaard, M.L., Oka, R., Hakkert, A., Schild, L., Ebus, M.E., van Gerven, M.R., Zwijnenburg, D.A., Molenaar, P., Hoyng, L.L., Dolman, M.E.M., Essing, A.H.W., Koopmans, B., Helleday, T., Drost, J., van Boxtel, R., Versteeg, R., Koster, J., Molenaar, J.J., 2021. Defects in 8-oxo-guanine repair pathway cause high frequency of C > A substitutions in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2007898118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007898118>
- van Gurp, R.J., Oosterhuis, J.W., Kalscheuer, V., Mariman, E.C., Looijenga, L.H., 1994. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86, 1070–1075. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.14.1070>
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J.R., Schoenfelder, G., 2012. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Cien Saude Colet* 17, 407–434. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232012000200015>

- Vasiljevic, T., Harner, T., 2021. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Sci Total Environ* 789, 148013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148013>
- Vernet, N., Dennefeld, C., Guillou, F., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., Mark, M., 2006. Prepubertal testis development relies on retinoic acid but not retinoid receptors in Sertoli cells. *EMBO J* 25, 5816–5825. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601447>
- Viel, A., Bruxelles, A., Meccia, E., Fornasarig, M., Quaia, M., Canzonieri, V., Policicchio, E., Urso, E.D., Agostini, M., Genuardi, M., Lucci-Cordisco, E., Venesio, T., Martayan, A., Diodoro, M.G., Sanchez-Mete, L., Stigliano, V., Mazzei, F., Grasso, F., Giuliani, A., Baiocchi, M., Maestro, R., Giannini, G., Tartaglia, M., Alexandrov, L.B., Bignami, M., 2017. A Specific Mutational Signature Associated with DNA 8-Oxoguanine Persistence in MUTYH-defective Colorectal Cancer. *EBioMedicine* 20, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.022>
- Vincent, M.-C., Daudin, M., De, M.P., Massat, G., Mieuisset, R., Pontonnier, F., Calvas, P., Bujan, L., Bourrouillout, G., 2002. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* 23, 18–22; discussion 44-45. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02597.x>
- Vrooman, L.A., Oatley, J.M., Griswold, J.E., Hassold, T.J., Hunt, P.A., 2015. Estrogenic exposure alters the spermatogonial stem cells in the developing testis, permanently reducing crossover levels in the adult. *PLoS Genet* 11, e1004949. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004949>
- Waldvogel, S.M., Goodson, S.D., Sehorn, M.G., 2019. Stabilization of the Human DMC1 Nucleoprotein Filament. *Methods Mol Biol* 1999, 285–291. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9500-4_19
- Walsh, T.J., Croughan, M.S., Schembri, M., Chan, J.M., Turek, P.J., 2009. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch Intern Med* 169, 351–356. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.562>
- Wang, B., Zhou, W., Zhu, W., Chen, L., Wang, W., Tian, Y., Shen, L., Zhang, J., Shanghai Birth Cohort Study, 2018. Associations of female exposure to bisphenol A with fecundability: Evidence from a preconception cohort study. *Environ Int* 117, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.003>
- Wang, C., Zhou, B., Xia, G., 2017. Mechanisms controlling germline cyst breakdown and primordial follicle formation. *Cell Mol Life Sci* 74, 2547–2566. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2480-6>
- Wang, S., Hassold, T., Hunt, P., White, M.A., Zickler, D., Kleckner, N., Zhang, L., 2017. Inefficient Crossover Maturation Underlies Elevated Aneuploidy in Human Female Meiosis. *Cell* 168, 977-989.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.002>
- Wang, X., Haber, J.E., 2004. Role of Saccharomyces single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol* 2, E21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020021>
- Wang, Y., Wu, Y., Zhang, S., 2022. Impact of bisphenol-A on the spliceosome and meiosis of sperm in the testis of adolescent mice. *BMC Vet Res* 18, 278. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03336-y>
- Webster, K.E., O’Bryan, M.K., Fletcher, S., Crewther, P.E., Aapola, U., Craig, J., Harrison, D.K., Aung, H., Phutikanit, N., Lyle, R., Meachem, S.J., Antonarakis, S.E., de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Peterson, P., Carroll, B.J., Scott, H.S., 2005. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4068–4073. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500702102>
- Wei, B.-H., Hao, S.-L., Yang, W.-X., 2022. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and proliferation in mammals. *Histol Histopathol* 37, 825–838. <https://doi.org/10.14670/HH-18-461>
- Weinhouse, C., Bergin, I.L., Harris, C., Dolinoy, D.C., 2015. Stat3 is a candidate epigenetic biomarker of perinatal Bisphenol A exposure associated with murine hepatic tumors with implications

- for human health. *Epigenetics* 10, 1099–1110. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1107694>
- Weitzman, S.A., Turk, P.W., Milkowski, D.H., Kozlowski, K., 1994. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1261–1264. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1261>
- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., Sinclair, A.H., 2008. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells* 26, 339–347. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>
- Wilhelm, D., Englert, C., 2002. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* 16, 1839–1851. <https://doi.org/10.1101/gad.220102>
- Witschi, E., 1948. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadals folds. *Contributions to embryologie* 32, 67–80.
- Wolf, D.C., Crosby, L.M., George, M.H., Kilburn, S.R., Moore, T.M., Miller, R.T., DeAngelo, A.B., 1998. Time- and dose-dependent development of potassium bromate-induced tumors in male Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol* 26, 724–729. <https://doi.org/10.1177/019262339802600602>
- Wong, J.L., Créton, R., Wessel, G.M., 2004. The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1. *Dev Cell* 7, 801–814. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.014>
- Wong, J.L., Wessel, G.M., 2005. Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development. *Dev Biol* 288, 317–333. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.004>
- Wong, R.L.Y., Wang, Q., Treviño, L.S., Bosland, M.C., Chen, J., Medvedovic, M., Prins, G.S., Kannan, K., Ho, S.-M., Walker, C.L., 2015. Identification of secretoglobin Scgb2a1 as a target for developmental reprogramming by BPA in the rat prostate. *Epigenetics* 10, 127–134. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1009768>
- Wu, H., Eckhardt, C.M., Baccarelli, A.A., 2023. Molecular mechanisms of environmental exposures and human disease. *Nat Rev Genet* 24, 332–344. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00569-3>
- Wu, H., Mathioudakis, N., Diagouraga, B., Dong, A., Dombrovski, L., Baudat, F., Cusack, S., de Massy, B., Kadlec, J., 2013. Molecular basis for the regulation of the H3K4 methyltransferase activity of PRDM9. *Cell Rep* 5, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.035>
- Wu, J., Li, Z., 2008. Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.058>
- Wu, J., McKeague, M., Sturla, S.J., 2018. Nucleotide-Resolution Genome-Wide Mapping of Oxidative DNA Damage by Click-Code-Seq. *J Am Chem Soc* 140, 9783–9787. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b03715>
- Xia, B., Wang, Y., Wang, X., Wu, J., Song, Q., Sun, Z., Zhang, Y., 2018. In utero and lactational exposure of DEHP increases the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring through PSCA hypomethylation. *Toxicol Lett* 292, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.022>
- Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M.M., Wu, K., Fan, D., Nie, Y., Cai, Y., Zhang, Y.W., Yu, L.-R., Li, H., Zahnow, C.A., Xie, W., Chiu Yen, R.-W., Rassool, F.V., Baylin, S.B., 2017. CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell* 31, 653–668.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.005>
- Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., Wang, Y., 2016. Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget* 7, 10606–10615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7218>
- Xie, Y., Yang, H., Cunanan, C., Okamoto, K., Shibata, D., Pan, J., Barnes, D.E., Lindahl, T., McIlhatton, M., Fishel, R., Miller, J.H., 2004. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64, 3096–3102. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3834>

- Xu, H., Zhang, M., Hao, Z., Liang, C., 2022. hOGG1 rs1052133 Polymorphism and Prostate Cancer Risk: A Chinese Case-Control Study and Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 28, e938012. <https://doi.org/10.12659/MSM.938012>
- Xu, J., Osuga, Y., Yano, T., Morita, Y., Tang, X., Fujiwara, T., Takai, Y., Matsumi, H., Koga, K., Taketani, Y., Tsutsumi, O., 2002. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 456–462. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6644>
- Xu, Q., Hu, L., Miao, W., Fu, Z., Jin, Y., 2022. Parental exposure to 3-methylcholanthrene before gestation adversely affected the endocrine system and spermatogenesis in male F1 offspring. *Reprod Toxicol* 110, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.04.007>
- Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohinata, Y., Seki, Y., Saitou, M., 2006. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75, 705–716. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053686>
- Yajima, M., Wessel, G.M., 2011. The multiple hats of Vasa: its functions in the germline and in cell cycle progression. *Mol Reprod Dev* 78, 861–867. <https://doi.org/10.1002/mrd.21363>
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Shen, L., Inoue, A., Diep, D., Zhang, K., Zhang, Y., 2012. Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature* 492, 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature11709>
- Yang, L., Lu, D., Yang, B., Peng, Z., Fang, K., Liu, Z., Song, P., Ren, Z., Wang, L., Zhou, J., Dong, Q., 2021. DEHP-induced testicular injury through gene methylation pathway and the protective effect of soybean isoflavones in Sprague-Dawley rats. *Chem Biol Interact* 348, 109569. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109569>
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., Liang, G., 2014. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* 26, 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>
- Yao, H.H.-C., DiNapoli, L., Capel, B., 2003. Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development* 130, 5895–5902. <https://doi.org/10.1242/dev.00836>
- Yao, H.H.C., Matzuk, M.M., Jorgez, C.J., Menke, D.B., Page, D.C., Swain, A., Capel, B., 2004. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230, 210–215. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20042>
- Yenigül, N.N., Dilbaz, S., Dilbaz, B., Kaplanoğlu, İ., Güçel, F., Aldemir, O., Baser, E., Ozelci, R., Moraloglu Tekin, O., 2021. The effect of plastic bottled water consumption on outcomes of ICSI cycles undertaken for unexplained infertility. *Reprod Biomed Online* 43, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.04.010>
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., Zhao, G.Q., 2000. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14, 1053–1063. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0479>
- Ying, Y., Zhao, G.Q., 2001. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232, 484–492. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0173>
- Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T., Nabeshima, Y., 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133, 1495–1505. <https://doi.org/10.1242/dev.02316>
- Youn, C.-K., Song, P.I., Kim, M.-H., Kim, J.S., Hyun, J.-W., Choi, S.-J., Yoon, S.P., Chung, M.H., Chang, I.-Y., You, H.J., 2007. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase suppresses the oxidative stress induced apoptosis through a p53-mediated signaling pathway in human fibroblasts. *Mol Cancer Res* 5, 1083–1098. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0432>
- Yu, M., Xu, Y., Li, M., Li, D., Lu, Y., Yu, D., Du, W., 2018. Bisphenol A accelerates meiotic progression in embryonic chickens via the estrogen receptor β signaling pathway. *Gen Comp Endocrinol* 259, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.11.004>

- Yuan, C., Wang, L., Zhu, L., Ran, B., Xue, X., Wang, Z., 2019. N-acetylcysteine alleviated bisphenol A-induced testicular DNA hypermethylation of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) by increasing cysteine contents. *Ecotoxicol Environ Saf* 173, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.035>
- Zálešák, J., Lourdin, M., Krejčí, L., Constant, J.-F., Jourdan, M., 2014. Structure and dynamics of DNA duplexes containing a cluster of mutagenic 8-oxoguanine and abasic site lesions. *J Mol Biol* 426, 1524–1538. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.022>
- Zamudio, N., Barau, J., Teissandier, A., Walter, M., Borsos, M., Servant, N., Bourc'his, D., 2015. DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination. *Genes Dev* 29, 1256–1270. <https://doi.org/10.1101/gad.257840.114>
- Zhang, H.-Q., Zhang, X.-F., Zhang, L.-J., Chao, H.-H., Pan, B., Feng, Y.-M., Li, L., Sun, X.-F., Shen, W., 2012. Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep* 39, 5651–5657. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1372-3>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W., 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling [WWW Document]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, T., Zhou, Y., Li, L., Zhao, Y., De Felici, M., Reiter, R.J., Shen, W., 2018. Melatonin protects prepuberal testis from deleterious effects of bisphenol A or diethylhexyl phthalate by preserving H3K9 methylation. *J Pineal Res* 65, e12497. <https://doi.org/10.1111/jpi.12497>
- Zhang, X., Zhang, Y., Wang, C., Wang, X., 2023. TET (Ten-eleven translocation) family proteins: structure, biological functions and applications. *Signal Transduct Target Ther* 8, 297. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01537-x>
- Zhang, X.-F., Zhang, L.-J., Feng, Y.-N., Chen, B., Feng, Y.-M., Liang, G.-J., Li, L., Shen, W., 2012. Bisphenol A exposure modifies DNA methylation of imprint genes in mouse fetal germ cells. *Mol Biol Rep* 39, 8621–8628. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1716-7>
- Zhao, H., Wang, Q., Liu, C., Shang, Y., Wen, F., Wang, F., Liu, W., Xiao, W., Li, W., 2018. A Role for the Respiratory Chain in Regulating Meiosis Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 208, 1181–1194. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300689>
- Zhou, J., Liu, M., Fleming, A.M., Burrows, C.J., Wallace, S.S., 2013. Neil3 and NEIL1 DNA glycosylases remove oxidative damages from quadruplex DNA and exhibit preferences for lesions in the telomeric sequence context. *J Biol Chem* 288, 27263–27272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479055>
- Zhou, W., Fang, F., Zhu, W., Chen, Z.-J., Du, Y., Zhang, J., 2016. Bisphenol A and Ovarian Reserve among Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Environ Res Public Health* 14, 18. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010018>
- Zhou, X., Zhuang, Z., Wang, W., He, L., Wu, H., Cao, Y., Pan, F., Zhao, J., Hu, Z., Sekhar, C., Guo, Z., 2016. OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation. *Cell Signal* 28, 1163–1171. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.05.021>
- Zhu, J., Fleming, A.M., Burrows, C.J., 2018. The RAD17 Promoter Sequence Contains a Potential Tail-Dependent G-Quadruplex That Downregulates Gene Expression upon Oxidative Modification. *ACS Chem Biol* 13, 2577–2584. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00522>
- Zhu, T., Brown, A.P., Ji, H., 2020. The Emerging Role of Ten-Eleven Translocation 1 in Epigenetic Responses to Environmental Exposures. *Epigenet Insights* 13, 2516865720910155. <https://doi.org/10.1177/2516865720910155>
- Zyner, K.G., Simeone, A., Flynn, S.M., Doyle, C., Marsico, G., Adhikari, S., Portella, G., Tannahill, D., Balasubramanian, S., 2022. G-quadruplex DNA structures in human stem cells and differentiation. *Nat Commun* 13, 142. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27719-1>

Summary

Impact of oxidative DNA damage on germ cell differentiation

Only germ cells (GCs) can undergo meiosis, an essential mechanism for the formation of the haploid gametes needed for sexual reproduction. Meiosis is a complex, finely regulated process whose proper functioning depends in mammals on events occurring before the onset of meiotic during fetal and neonatal life. Many environmental pollutants (EPs), such as bisphenol A (BPA), can disrupt germline differentiation and/or meiosis, resulting in fertility defects. A first part of my thesis examined the effects of fetal exposure to two structural analogues of BPA, bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) and bisphenol AF (BPAF), on oogenesis in mice. We observed a defect in germline differentiation (maintenance of pluripotency and delay in meiotic initiation), an increase in the number of MLH1 foci, a meiotic protein, and an increase in aneuploid oocytes. Using a xenograft model, we also studied the impact of chronic exposure to a mixture of plasticizers, BPA and Diethylhexyl Phthalate (DEHP), on human male fetal differentiation. As observed in the murine ovary, the human fetal testis displayed a delay in CG differentiation following exposure to this mixture of pollutants. Furthermore, exposed CG show an increased capacity to form seminoma (testicular cancer) when transplanted into an adult mouse testis. The maintenance of GC pluripotency following fetal exposure to various PEs, regardless of gonadal somatic context (ovary and testis) and species (human and mouse), suggests a common, yet unknown, mechanism of action. Among possible molecular mechanisms, most PEs have a pro-oxidant effect. The most commonly observed lesion after oxidation in the nucleus is 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OdG), resulting from the oxidation of a guanine. In addition to its mutagenic effect, this oxidative damage can have direct epigenetic repercussions by recruiting the transcriptional machinery, or indirect epigenetic repercussions by affecting the chromatin environment or interfering with proteins involved in DNA methylation/demethylation. Thus, the aim of my work was to characterize the impact of 8-OdG on murine male CG differentiation and to study its long-term effects on fertility. To this end, we combined a genetic model, with mice invalidated for *8-oxoguanine DNA glycosylase 1* (*Ogg1*) responsible for recognition and initiation of repair of 8-OdG-type lesions, and a chemical model, using a pro-oxidant agent, potassium bromate ($KBrO_3$), which specifically induces 8-OdG and allows us to form oxidative damage at key moments in germline differentiation. We have shown for the first time that murine male CGs are highly sensitive to 8-OdG-type oxidative DNA damage and that they present a specific window of sensitivity, neonatal life, during which significant 8-OdG formation leads to permanent impairment of spermatogenesis. Several months after exposure to $KBrO_3$, a reduction in the spermatogonial stem cells pool and various meiotic defects are observed in the adult testis, potentially leading to the formation of aneuploid gametes. This resulted in an overall reduction in the fertility of the mice. Finally, the 8-OdGs produced caused *de novo* germline DNA mutations, transmissible to offspring and responsible for the appearance of facial malformations on several occasions in our mice. Taken together, our results suggest that 8-OdG-type oxidative DNA damage could be a common mechanism of action for many pro-oxidant EPs.

Key words: Germ cells, oxidative DNA damage, environmental pollutants, germline differentiation, meiosis, fertility, *de novo* mutations, testicular cancer.

Résumé

Impact des dommages oxydatifs de l'ADN sur la différenciation des cellules germinales

Les cellules germinales (CG) sont les seules cellules capables de réaliser la méiose, mécanisme indispensable à la formation de gamètes haploïdes nécessaires à la reproduction sexuée. La méiose est un processus complexe et finement régulé dont le bon fonctionnement, chez les mammifères, repose en partie sur des événements antérieurs à l'initiation méiotique, en vie fœtale et néonatale. De nombreux polluants environnementaux (PE), tels que le bisphénol A (BPA), sont capables d'induire des défauts de fertilité par perturbation de la différenciation germinale et/ou de la méiose. Au cours de ma thèse, nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'exposition fœtale à deux analogues structuraux du BPA, le bisphénol A Diglycidyl Ether (BADGE) et le bisphénol AF (BPAF), sur l'ovogenèse chez la souris. Nous avons observé un défaut de différenciation germinale (maintien de la pluripotence et délai de l'initiation méiotique), une augmentation du nombre de foyer MLH1, une protéine méiotique, et une augmentation de l'aneuploïdie ovocytaire. En parallèle, nous avons étudié l'impact d'une exposition chronique à un mélange de plastifiants, le BPA et le Diethylhexyl Phthalate (DEHP), sur la différenciation fœtale mâle humaine grâce à un modèle de xénogreffe. De la même manière que dans l'ovaire murin, nous observons un délai de différenciation des CG dans le testicule fœtal humain suite à l'exposition à ce mélange de polluants. De plus, les CG exposées présentent une tendance accrue à former un séminome (cancer testiculaire) lorsqu'elles sont transplantées dans un testicule de souris adulte. Le fait que l'exposition fœtale à divers PE entraîne un maintien de la pluripotence des CG indépendamment du contexte somatique gonadique (ovaire et testicule) et de l'espèce (humain et souris) suggère un mécanisme d'action commun, encore inconnu. Parmi les mécanismes moléculaires possibles, la plupart des PE présentent un effet pro-oxydant. Dans le noyau, la lésion la plus couramment observée après oxydation est la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OdG), résultat de l'oxydation d'une guanine. Outre son effet mutagène, ce dommage oxydatif peut avoir des répercussions épigénétiques directes, en recrutant la machinerie transcriptionnelle, ou indirectes, en impactant l'environnement chromatinien ou en interférant avec les protéines impliquées dans la méthylation/déméthylation de l'ADN. Ainsi, mes travaux ont eu pour objectif de caractériser l'impact de la 8-OdG sur la différenciation des CG males murines et d'étudier les effets à long-terme sur la fertilité. Pour cela, nous avons combiné un modèle génétique, avec des souris invalidées pour la *8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1)* chargée de reconnaître les lésions de type 8-OdG et d'initier leur réparation, et un modèle chimique, avec l'utilisation d'un agent pro-oxydant, le bromate de potassium (KBrO₃), qui induit spécifiquement des 8-OdG et nous permet de former des dommages oxydatifs à des moments clés de la différenciation germinale. Nous avons montré pour la première fois que les CG mâles murines sont très sensibles aux dommages oxydatifs de l'ADN de type 8-OdG et qu'elles présentent une fenêtre de sensibilité spécifique, la vie néonatale, au cours de laquelle une formation importante de 8-OdG entraîne une altération permanente de la spermatogenèse. En effet, nous observons dans le testicule adulte, plusieurs mois après l'exposition au KBrO₃, une diminution du pool de cellules souches spermatogoniales et divers défauts méiotiques pouvant conduire à la formation de gamètes aneuploïdes. Cela conduit à une baisse globale de la fertilité des souris. Enfin, les 8-OdG produites ont conduit à des mutations *de novo* de l'ADN germinal, transmissibles à la descendance et responsables de l'apparition de malformations faciales à plusieurs reprises chez nos souris. Ensemble, nos résultats suggèrent que les lésions oxydatives de l'ADN de type 8-OdG pourraient être un mécanisme d'action commun à de nombreux PE pro-oxydants.

Mot-clés : Cellules germinales, dommages oxydatifs de l'ADN, polluants environnementaux, différenciation germinale, méiose, fertilité, mutations *de novo*, cancer testiculaire.

Liste des éléments sous droits

Liste des éléments retirés de la version complète de la thèse faute d'en détenir les droits.

- Article : *Foetal exposure to the bisphenols BADGE and BPAF impairs meiosis through DNA oxidation in mouse ovaries*, Résultats partie I – pages 78 à 110.

- Article en annexe : *First experimental evidence of the impact of endocrine disrupting compounds on testicular cancer in humans*, Annexe – pages 158 à 190.